



# VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展

向本旭<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>1</sup>, 孙芳玲<sup>1</sup>, 艾厚喜<sup>1</sup>, 王文<sup>1,2</sup>

(1. 首都医科大学宣武医院, 北京 100053; 2. 北京市脑重大疾病研究院, 北京 100069)

**【摘要】** 组织器官在生理或病理状态下, 受到促血管生成因子的刺激, 引发生血管新生。VEGF、Notch、Wnt/ $\beta$ -catenin、Ang1(2)/tie2、PI3K-AKT 等多个信号通路参与到该过程, 对血管新生的各个阶段产生影响。其中 VEGF 联系众多信号通路, 对血管新生整个过程进行调节, 发挥了无可替代的作用。近年来国内外对 VEGF 及相关信号通路调节血管新生机制的研究取得了一定的进展, 对多种疾病发病机制的阐明及临床药物的研发提供了新的理论依据。我们总结了近年来相关研究成果, 希望为血管新生相关疾病的治疗提供新的可能性。

**【关键词】** VEGF; 血管新生; 研究进展

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0081-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.016

## Advances in research on VEGF-related signaling pathways in angiogenesis

XIANG Ben-xu<sup>1</sup>, LIU Ting-ting<sup>1</sup>, SUN Fang-ling<sup>1</sup>, AI Hou-xi<sup>1</sup>, WANG Wen<sup>1,2</sup>

(1. Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China;

2. Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100069, China)

**【Abstract】** Tissues and organs generate angiogenesis under the stimulation of angiogenic factors in physiological or pathological conditions. Multiple signal pathways including VEGF, Notch, Wnt/ $\beta$ -catenin, Ang1(2)/tie2 and PIK-Akt etc. have effects on various stages of angiogenesis. VEGF exerts irreplaceable effects on the whole process of angiogenesis through multiple signal pathways. Over the past few years, new progress has been made in the researches of mechanisms regulating angiogenesis through VEGF-related signal pathways both at home and abroad. These findings provide us new theoretical basis for clarification of the pathogenesis of many diseases and clinical drug development. In this article we will summarize the recent research progress in this field, hoping to provide new possibilities for the treatment of angiogenesis-related diseases.

**【Key words】** VEGF; Angiogenesis; Research progress

哺乳动物血管新生始于胚胎期血管网络的形成过程, 在低氧或炎症的诱导下, VEGF、bFGF、PDGF 这类促血管生成因子大量产生, 与血管内皮细胞膜上的相应受体相结合进而引发下游信号级联, 促进血管新生。血管新生依赖血管外促血管生成因子的刺激, 在细胞外基质蛋白酶的作用下首

先引起血管基底膜被溶解, 进而促进血管内皮细胞向血管外游离形成新生血管, 后经过重构和成熟, 新生微血管逐步融入现存血管系统, 形成稳定的血管。VEGF 介导的各信号级联分别参与上述血管新生各个过程, 直接控制血管新生的发生发展, 在一定程度上决定了血管新生的结果。

**【基金项目】** 1. “重大新药创制”科技重大专项, 项目编号: 2012ZX09102201-106; 2. 国家自然科学基金项目编号: 81373994。

**【作者简介】** 向本旭 (1990 - ), 男, 硕士研究生, 研究方向: 神经药理。E-mail: xiangbenxu@126.com。

**【通讯作者】** 王文 (1968 - ), 男, 博士研究生导师, 研究方向: 神经药理, 中药药理。E-mail: lzwwang@163.com。

## 1 VEGF 与 VEGFRs 的结构和作用

### 1.1 VEGF 结构与作用

血管内皮生长因子 (vascular endothelia growth factor, VEGF) 是目前所有促血管生成因子中研究最多最清楚的一个, VEGF 信号通路参与到血管新生整个过程, 发挥了无可替代的作用。VEGF 最早在 1983 年由 Senger 等<sup>[1]</sup>发现, 由两条 8 个外显子和 7 个内含子组成的 23 kD 的单链蛋白构成。在转录过程中, VEGF mRNA 拼接方式的不同形成 6 种 VEGF 异构体, 即 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和 VEGF-F, 其中 VEGF-A 又包括 7 种单体, 它们分别是 VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>145</sub>、VEGF<sub>148</sub>、VEGF<sub>143</sub>、VEGF<sub>189</sub>、VEGF<sub>165</sub> 和 VEGF<sub>206</sub>, A 类的 VEGF 在多种正常组织器官如肺、肾、心、卵巢等上表达, 同时它也是促进肿瘤血管生长的主要因子; B 类的 VEGF 包括两种单体: VEGF<sub>167</sub> 和 VEGF<sub>186</sub>, 其主要表达位点在心肌、骨骼肌、胰腺、肾脏、卵巢等正常组织上, 其作用与 VEGF<sub>165</sub> 相似; VEGF-C 在淋巴管上表达, 是第一个发现的淋巴管生长因子; VEGF-D 与 VEGF-C 结构类似, 但表达位置主要在正常组织中, 包括心、肺、骨骼肌、结肠和小肠等。

众多研究发现<sup>[2-7]</sup>, VEGF 对骨、肺、肾脏、脑、肿瘤等全身各组织器官血管内皮细胞的增殖、迁移和趋化有十分明显的促进作用。病理状态下, 缺氧是促进 VEGF 合成的最主要的因素, 研究表明<sup>[8]</sup>, 细胞在缺氧状态下 VEGF 的合成量会增高 12 倍, 细胞缺氧会引起缺氧诱导因子 HIF-1 的释放, 继而促进 VEGF 基因转录。David 等<sup>[9]</sup>研究发现, VEGFs 对脑卒中后缺血灶局部血管新生有明显的促进作用, 其机制是在损伤和缺氧的双重刺激下, VEGF 促进缺血半暗带内残存毛细血管内皮细胞的增殖和迁移, 从而促进了血管的新生。另外炎症及肿瘤生长等刺激也是促进病理条件下 VEGF 释放的主要因素。

### 1.2 VEGFRs 的结构及作用

VEGF 有三种受体 VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (KDR)、VEGFR-3 (Flt-4), 它们都属于受体酪氨酸激酶超家族膜蛋白, 在胞膜外大约含 750 个氨基酸残基, 由 7 个与 IgG 相似的结构域组成; 其在膜内属于酪氨酸激酶区, 被一个由 70 个氨基酸构成的激酶分开, 最末端是 C 端。对 VEGFR 结构域和功能性的研究表明, Flt-1 膜外第二个 Ig 结构域是其与配体结合的主要部位; 而 KDR 与配体结合的部位主要在第

三个 Ig 结构域<sup>[10-12]</sup>。VEGFR-1 在体内与 VEGF-A 和 VEGF-B 结合激发下游信号; VEGFR-2 主要与 VEGF-A 和 VEGF-E 结合; VEGFR-3 与 VEGF-C 和 VEGF-D 结合; VEGF-C 及 VEGF-D 经过蛋白酶解后也能与 VEGFR-2 结合, 但结合效率远低于 VEGFR-3<sup>[13]</sup>。

Wang 等<sup>[14]</sup>研究表明, VEGFR 发挥促血管新生的作用须通过其内化作用。Jain 等<sup>[15]</sup>发现 VEGFR-2 在早期成血管细胞的发育中起重要作用, 敲除该基因会导致胚胎成血管细胞和造血干细胞缺失。VEGFR-1 在成血管细胞组合为成血管的过程中扮演重要角色, 该基因的缺失会导致成血管生成障碍。最新研究<sup>[16]</sup>显示, VEGFR-3 在 Snail 的调控下直接影响微血管分支的发生以及血管网络的构成, 并证明了在视网膜微血管纵向芽生中起主要作用的是 VEGFR-3 而非 VEGFR-2。在体内 VEGF 三种受体通常不会单独发挥作用, 在不同细胞和不同时间, 起主要作用的 VEGF 受体也处于动态变化中。

## 2 血管新生早期 VEGF 信号通路促进血管基底膜分解及足体环的形成

通常组织器官在外伤、炎症、肿瘤生长或缺氧等影响下, 病理局部诱导产生 VEGFs、EGF、bFGF 这类促血管生长因子, 这些因子与内皮细胞膜上的相应受体结合, 从而引发相关信号级联的激活, 这些信号级联首先引起现存血管基底膜的分解, 以便内皮细胞增殖和迁移。成熟血管由血管内皮细胞紧密排列构成血管内膜, 内膜外是基底膜和壁细胞包裹形成的保护系统, 基底膜控制血管内外物质交换, 保证了血管系统稳的稳定。基底膜主要由层粘连蛋白 (laminin)、IV 型胶原蛋白、巢蛋白和肝磷脂蛋白聚糖 (HSPGs) 组成, 但在不同部位和功能的组织上其比例和亚型有所差异<sup>[17]</sup>。在基底膜开始分解后, 血管内皮细胞从基底膜分解处开始向外生长, 形成新生血管芽的前体—足体环 (podosome rosette), 该结构由局部大量内皮细胞聚集形成, 具有较强的组织侵袭能力, 血管芽由内皮细胞此结构的基础上增殖和迁移逐渐形成。

在血管新生过程中, VEGF-A 是 VEGF 信号通路中促进基底膜分解的主要因子, 研究显示<sup>[18]</sup>, 存在于细胞外基质中的 VEGF-A 与血管内皮细胞膜上的 VEGFR2 结合后, 激活 Src 信号通路, 最终促进血管内皮细胞上  $\alpha_6\beta_1$  整合素与其配体 laminin 的分离。血管新生初期, VEGF 信号使该部位粘附分子

作用减弱,基底膜和壁细胞的完整系统降解,有利于足体环的形成。Seano 等<sup>[19]</sup>人研究发现,laminin 敲除小鼠在外源性 VEGF-A 的作用下,其足体环数目比野生型小鼠显著增多,证明 laminin 不利于 VEGF-A 引起的足体环增多。他们还通过体内外实验发现 VEGF 处理的内皮细胞形成了更多的由 PMA 信号引起的足体环,而非 PCK 或 TGF $\beta$  信号。 $\alpha_6\beta_1$  整合素对内皮细胞与胞外域之间的粘附性起重要作用,它也是足体环向胞外域迁移的主要功能蛋白。VEGF-A 可促进足体环局部  $\alpha_6\beta_1$  整合素增多,激活金属基质蛋白酶(MT-MMP),从而促进足体环向胞外域迁移<sup>[20]</sup>。金属基质蛋白酶对基底膜及壁细胞的降解起调控作用,VEGF 可促进 MT-MMP1 在顶端细胞(tip cell)上高表达,同时 MMPs 会释放一些细胞外基质中缺乏的促血管生长因子,促进血管新生<sup>[21]</sup>。此外,在血管新生初期,VEGF 介导血管内皮细胞快速分泌血管生成素 2(ANG-2)有利于基底膜和壁细胞的分解,在一定程度上加速了这一过程<sup>[22]</sup>。

### 3 VEGF 促进内皮细胞芽生

血管新生中内皮细胞的芽生及迁移是最重要的一环,它包括内皮细胞增殖,分化为顶端细胞和茎细胞(stalk cell),丝状伪足和板状伪足的迁移等多个环节。局部血管基底膜分解后,内皮细胞在该局部增殖后逐渐向血管外迁移,细胞外基质中的 VEGF 介导胞内 Notch-Dll4 等信号通路促进内皮细胞分化为顶端细胞和茎细胞,逐渐形成血管芽。顶端细胞和茎细胞在 VEGF、FGF 等多种因子的作用下产生伪足结构,有利于其迁移、粘附及微血管网络的形成。

#### 3.1 VEGF 介导 PLC $\gamma$ 1、PI3K-AKT 促进内皮细胞增殖

大量研究表明 VEGF 主要通过其下游 PLC $\gamma$ 1、PI3K-AKT 信号通路促进内皮细胞增殖。VEGF-A/VEGFR2 信号由 PLC $\gamma$ 1 通过促进其激动激酶 C 和 Raf-MEK 信号通路,最终通过 Erk1/2 促进血管内皮细胞的增殖<sup>[23]</sup>。VEGF 介导的 PLC $\gamma$ 1 信号还可以通过上调内皮细胞中的 mTORC1 活性,促进存在于内质网中的 ATF6、IRE1 $\alpha$ <sup>[24]</sup>。VEGFR2 存在多个酪氨酸磷酸化位点,1054 和 1059 号位点使 Cbl 磷酸化,磷酸化的 Cbl 通过抑制 PLC $\gamma$ 1 激活能抑制肿瘤血管内皮细胞增殖,从而抑制其血管新生<sup>[25]</sup>。

VEGF-Akt 是经典的促进内皮细胞增殖与存活,抑制细胞凋亡,促进血管新生的信号通路。研究显示 VEGF 通过下游 PI3K-Akt 的信号级联,通过 BAD 途径抑制细胞凋亡,分别通过 mTORC2 和 FOXO1 促进内皮细胞增殖和血管新生,其中 mTORC2 途径对 PLC $\gamma$ 1 促进内皮细胞增殖同样重要<sup>[26-28]</sup>,PLC $\gamma$ 1 通过内质网中的 ATF6 等蛋白最终上调 mTORC2 基因的表达,与 Akt 共同促进内皮细胞增殖。

#### 3.2 Notch 信号通路调节内皮细胞分化

受到 VEGF 等促血管生成因子激活的血管内皮细胞逐渐分化为顶端细胞和茎细胞,这两种细胞在功能上有一定差异,Notch/Dll4 信号调控了这一分化,保证两种细胞表达的平衡。VEGF 与 KDR 结合后,首先激活内皮细胞中的 Dll4 与其相邻内皮细胞中的受体 Notch,该信号优先诱导内皮细胞分化为茎细胞,顶端细胞的形成则受到 Notch 信号通路相关蛋白 Nrp1 的调控。内皮细胞中的 Nrp1 受到激活的 Notch 的影响而低表达,促使相邻内皮细胞上的 Nrp1 表达量升高,这一结果抑制了 pSmad2/3 和 pSmad1/5/8 的表达,使该血管内皮细胞向顶端细胞分化<sup>[29]</sup>。内皮细胞分化的结果是 Dll4 和 Notch 在两种细胞上的表达量有差异,在顶端细胞上 Dll4 高表达而 Notch 低表达,茎细胞上两者的表达量正好相反。Phng<sup>[30]</sup>指出 Dll4 有利于顶端细胞的增殖,但过量的 Dll4 诱导形成的新生血管存在功能上的缺陷,这些血管缺乏有效的血流灌注。内皮细胞中高表达的 Notch 能显著抑制其顶端细胞的增殖,且这样形成的新生血管同样存在血管渗漏等功能性缺陷。Notch 和 Dll4 在相邻血管内皮细胞上表达的平衡由 Notch 的另一配体 Jag1 反馈调节,Adam<sup>[31]</sup>等研究发现内皮细胞中 Notch 高表达的茎细胞中产生 Jag1,但它不通过激动 Notch 发挥作用,而是抑制该内皮细胞中 Dll4 向相邻内皮细胞 Notch 传递的反馈信号,从而平衡两相邻内皮细胞中 Dll4 和 Notch 的表达。Notch 除了通过 Dll4 和 Jag1 信号通路外,还将信号反馈给内皮细胞膜上的 VEGFR2/3,调节细胞膜上 VEGF 受体数量来反馈调节 VEGF 信号通路<sup>[32]</sup>。

由 VEGF-A 介导的 Dll4 的表达对顶端细胞的形成有决定性作用,除了 Notch-Jag1 介导的反馈调节机制外,研究发现 MAPK 和 PI3K-AKT 介导的信号通路同样影响 Dll4 的表达<sup>[32]</sup>。通过 Snail1 基因敲除小鼠研究发现,VEGF-A 与 VEGFR2 结合后,通

过 MAPK 和 PI3K-AKT 两条信号通路均可抑制内皮细胞内 Gsk-3 $\beta$  活性,进而抑制 Snail1 的表达。胚胎期的 Snail1 基因敲除小鼠血管内皮细胞中 Dll4 和 Notch 表达量升高,但它又抑制了 Dll4 相关的  $\gamma$  分泌酶的反馈调节,在一定程度上控制了顶端细胞的形成和胚胎血管发育<sup>[33, 34]</sup>。Dll4 的表达受到 Notch 胞内域(NICD)的影响,Snail1 最终通过该途径调节 Dll4 的表达<sup>[32]</sup>。

### 3.3 小 GTP 酶和 Rho 家族蛋白调节伪足形成

顶端细胞和茎细胞均存在末端的生长结构,一种是处于最前端的呈细丝状的丝状伪足(filopodia)和连接丝状伪足与内皮细胞的较宽大的板状伪足。被 VEGF 信号激活的内皮细胞存在众多丝状伪足,它们引导内皮细胞向有利的微环境生长。Lars<sup>[35]</sup>利用胚胎干细胞研究显示,位于顶端细胞上的丝状伪足引导整个新生微血管的生长方向与速度,这在一定程度上取决于该内皮细胞膜上 VEGFR1/2、FGFR 的数量与胞外的 VEGF 和 FGF 浓度,Nrarp 协同 Wnt 信号促进 NICD 介导的 VEGFR 反馈调节机制,平衡了这一过程。丝状伪足和板状伪足是高灵敏的结构,它们在血管内皮细胞接收 VEGF 信号后几分钟内就会产生<sup>[36]</sup>,该过程在 GTP 酶激动蛋白和鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEFs)的共同作用下,对小 GTP 酶的活性进行调节从而调控 Rho 家族蛋白表达<sup>[37]</sup>。Frederik<sup>[38]</sup>研究显示 Rho 家族蛋白对内皮细胞的丝状伪足和板状伪足的生长和迁移起主要调节作用,在丝状伪足上 Cdc42 高表达,在板状伪足上 Rho 的另一亚族蛋白 Rac1 高表达。伪足在构成上主要由 F-actin 主导,在丝状伪足上 F-actin 呈线性排列;而在板状伪足上,F-actin 存在较多分支,形成有一定支撑能力的网状结构<sup>[39]</sup>。F-actin 的表达受到 Rho 家族蛋白的影响,Cdc42 与 Rac1 通过 actin 相关蛋白 2/3(ARP2/3)和 WASP 调节 F-actin 的分支活动,控制其网络的形成。RhoA 通过其下游 ROCK 蛋白激酶,Cdc42 与 Rac1 通过 P<sub>21</sub> 激动激酶激活 LIMK,LIMK 通过抑制丝切蛋白表达进而抑制了 F-actin 解聚,调节两种伪足的表达<sup>[38-41]</sup>。

## 4 VEGF 调节新生血管网络的形成与重构

血管新生发生的局部通常能发现大量的新生微血管聚集且形成网络,它们这种网络通常由相邻血管丝状伪足的相互连接引发,随后经历血管重构,逐渐转变为成熟的血管网络。血管网络的形

成、重构与 VEGF 信号密不可分,其中钙粘素、整合素及 KLF 等蛋白发挥了主要作用。

### 4.1 VEGF 通过 $\beta$ -catenin/VE-cadherin 促进血管网络形成

研究发现,血管内皮细胞在 VEGF 信号的刺激下迅速芽生,在 Notch/Dll4 和 MAPK 等信号通路的调控下产生大量丝状伪足<sup>[24, 28, 32]</sup>,相邻微血管的丝状伪足通常粘接到一起,从而引导微血管形成环状血管结构,大量微血管之间相互交错形成微血管网络<sup>[42]</sup>。研究显示<sup>[43]</sup>,丝状伪足顶端存在细胞外基质粘附域,通过该区域丝状伪足可以与胞外域产生粘附作用,血管内皮钙粘素(VE-cadherin)是该区域起粘附作用的主要蛋白。血管内皮钙粘素的表达很大程度依赖 VEGF 信号对血管内皮细胞的激活,激活的血管内皮细胞膜上血管内皮钙粘素迅速分泌,该过程由 VEGF 介导的 PI3K 信号通路调节<sup>[44]</sup>。

Wnt 介导的卷曲蛋白-4(frizzled-4)和  $\beta$  整合素( $\beta$ -catenin)也是血管内皮钙粘素的调节蛋白,有研究显示 frizzled-4 与  $\beta$ -catenin 在 Wnt 的激活下,受到 ETS 转录因子 ERG 的调控,最终通过上调血管内皮钙粘素提高新生血管网络的稳定性<sup>[45]</sup>。 $\beta$ -catenin 的表达同样受到 VEGF 的影响,有研究显示  $\beta$ -catenin 对早期血管的生成无明显作用,但会降低血管通透性,从而促进血管的稳定<sup>[46]</sup>;Corada<sup>[47]</sup>对血管内皮细胞  $\beta$ -catenin 敲除后发现血管生成不受影响,但会引起血管高枝化,不利于血管稳定。

### 4.2 VEGF 调节与促进血管网络重构成熟

新生血管转变为成熟的血管还依赖壁细胞的重新生募集与成熟,与 VEGF 信号调控基底膜和壁细胞降解一样受到 Tie2-Ang1 调节。VEGF 信号在血管新生后期逐渐减弱,与初期 Ang1 低表达相反,此时 Ang1 高表达促进壁细胞募集与稳定、抑制 VEGF 信号引起的血管壁通透性增加,从而促进血管及其网络的稳定与成熟<sup>[48]</sup>。壁细胞的成熟还在一定程度上受到酪氨酸激酶家族蛋白 ephrinB2 的影响,Pitulescu<sup>[49]</sup>的研究显示内皮细胞 ephrinB2 的缺失会导致壁细胞迁移以致新生血管结构缺陷。此外,Notch 信号对壁细胞的成熟有促进作用,研究显示 Notch3 缺失的小鼠新生血管壁细胞不能募集,小动脉功能受损<sup>[50]</sup>。

新生血管网络形成后,在网络结构上较为杂乱,不能对组织形成有效的血流灌注,网络中部分血管血流低灌注甚至无灌注,这些血管最终降解,

使整个血管网络成熟化和有序化。内皮细胞在 VEGF 信号减弱后逐渐从激动状态转变为静息态,该过程一方面依赖 Notch/Dll4 对内皮细胞膜上的 VEGF 受体反馈调节机制影响<sup>[25]</sup>;另一方面新生血管网络部分血管血流灌注使血管内皮细胞受到感应剪切力,内皮细胞膜上的剪切力应答转录因子 KLF2 被激活,促使 eNOS 与血栓调节蛋白高表达,反馈调节 VEGFR2,使内皮细胞膜上 VEGFR2 数量减少。Nicoli 等<sup>[51]</sup>在斑马鱼上的实验证明了 KLF2 的这一调节最终通过 MAPK/PI3K 完成。新生微血管网络中部分血管血流量降低,则该血管内皮细胞中 KLF2 减少,最终导致血管内皮细胞凋亡、血管的阻塞和分解,促进血管网络重构。

## 5 总结与展望

已知肿瘤生长、眼血管新生疾病、脑卒中、肢体硬化症等多种疾病的发生发展与血管新生(缺失)相关,抑制(促进)病变组织器官血管新生是一种有效的治疗手段。在过去的几十年里,对 VEGF 下游信号的研究取得了大量的成果,在体内外的研究中均显示了其对血管新生强大的调控作用,并且已有贝伐单抗这类药物应用于临床。VEGF 联系众多信号通路,在血管新生整个过程中具有最直接有效的调控作用,对 VEGF 调节血管新生相关信号通路的进一步研究有利于新药的研发与临床治疗,具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Senger DR, Perruzzi CA, Feder J. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines [J]. *Cancer Res*, 1986, 46 (11): 5629–5632.
- [2] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation [J]. *Nat Med*, 1999, 5 (6): 623–628.
- [3] Lee CG, Link H, Baluk P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung [J]. *Nat Med*, 2004, 10(10): 1095–10103.
- [4] Zhao T, Zhao W, Meng W, et al. VEGF-C/VEGFR-3 pathway promotes myocyte hypertrophy and survival in the infarcted myocardium [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7 (4): 697–709.
- [5] Iacovelli R, Sternberg CN, Porta C, et al. Inhibition of the VEGF/VEGFR pathway improves survival in advanced kidney cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 16(2): 164–170.
- [6] Quittet MS, Touzani O, Sindji L, et al. Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat [J]. *Acta Biomater*, 2015, 15: 77–88.
- [7] Dzielko M, Derugin N, Wendland MF, et al. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(2): 189–200.
- [8] Yang X, Zhu H, Ge Y, et al. Melittin enhances radiosensitivity of hypoxic head and neck squamous cell carcinoma by suppressing HIF-1 $\alpha$  [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10443–10448.
- [9] Greenberg DA, Jin KL. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(10): 1753–1761.
- [10] Suto K, Yamazaki Y, Morita T, et al. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 2126–2131.
- [11] Muller YA, Li B, Christinger HW, et al. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(14): 7192–7197.
- [12] De Falco S, Gigante B, Persico MG. Structure and function of placental growth factor [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12 (6): 241–246.
- [13] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2005, 109 (3): 227–241.
- [14] Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Nature*, 2010, 465(7297): 483–486.
- [15] Jain S, Ward MM, O'Loughlin J, et al. Incremental increase in VEGFR1<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells and VEGFR2<sup>+</sup> endothelial progenitor cells predicts relapse and lack of tumor response in breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132(1): 235–242.
- [16] Park JA, Kim DY, Kim YM, et al. Endothelial snail regulates capillary branching morphogenesis via vascular endothelial growth factor [J]. *Plos Genet*, 2015, 11(7): e1005324.
- [17] Nikolova G, Strlic B, Lammert E. The vascular niche and its basement membrane [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(1): 19–25.
- [18] Destaing O, Planus E, Bouvard D, et al.  $\beta$ 1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(23): 4108–4119.
- [19] Seano G, et al. Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16 (10): 931–941.
- [20] Schachtner H, Calamins SDJ, Thomas SG. Podosomes in

- adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling [J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2013, 70(10): 572–589.
- [21] Arroyo AG, Iruela-Arispe ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 226–235.
- [22] Augustin HG, Koh GY, Thurston G, et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3): 165–177.
- [23] Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, et al. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- $\gamma$  and DNA synthesis in vascular endothelial cells [J]. *EMBO*, 2001, 20(11): 2768–2778.
- [24] Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1 [J]. *Cell Metab*, 2006, 4(3): 245–254.
- [25] Krawczyk P, Matuszyk J. The mechanism of phospholipase C $\gamma$ 1 activation [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2011, 65: 470–477.
- [26] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex [J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098–10101.
- [27] Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity [J]. *Cell*, 2006, 127(1): 125–137.
- [28] Rotllan N, Wanschel AC, Fernández-Hernando A, et al. Genetic evidence supports a major role for Akt1 in VSMCs during atherogenesis [J]. *Circ Res*, 2015, 116(11): 1744–1752.
- [29] Aspalter IM, Gordon E, Dubrac A, et al. Alk1 and Alk5 inhibition by Nrp1 controls vascular sprouting downstream of Notch [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7264.
- [30] Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch [J]. *Dev Cell*, 2009, 16: 196–208.
- [31] Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(5): 617–625.
- [32] Wu ZQ, Rowe RG, Lim KC, et al. A Snail1/Notch1 signalling axis controls embryonic vascular development [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3998.
- [33] de la Pompa JL, Epstein JA. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease [J]. *Dev Cell*, 2012, 22(2): 244–254.
- [34] Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 347–376.
- [35] Meyer RD, Husain D, Rahimi N. c-Cbl inhibits angiogenesis and tumor growth by suppressing activation of PLC $\gamma$ 1 [J]. *Oncogene*, 2011, 30(19): 2198–2206.
- [36] De Smet F, Segura I, De bock K, et al. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(5): 639–649.
- [37] Defilippi P, Olivo C, Venturino M, et al. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion [J]. *Microsc Res Tech*, 1999, 47(1): 67–78.
- [38] Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 453–465.
- [39] Jakobsson L, Claudio A, Franco C, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting [J]. *Nature Cell Biol*, 2010, 12(10): 943–953.
- [40] Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2003, 26: 509–563.
- [41] Defilippi P, Olivo C, Venturino M, et al. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion [J]. *Microsc Res Tech*, 1999, 47(1): 67–78.
- [42] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 873–887.
- [43] Bentley K, Franco CA, Philippides A, et al. The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis [J]. *Nature Cell Biol*, 2014, 16(4): 309–321.
- [44] Schäfer R, Abraham D, Paulus P, et al. Impaired VE-cadherin/beta-catenin expression mediates endothelial cell degeneration in dilated cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2003, 108(13): 1585–1591.
- [45] Franco CA, Liebner S, Gerhardt H. Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel? [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(5): 476–483.
- [46] Cattelino A, Liebner S, Gallini R, et al. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(6): 1111–1122.
- [47] Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, et al. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(6): 938–949.
- [48] Huang H, Bhat A, Woodnutt G, et al. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(8): 575–585.
- [49] Pitulescu ME, Adams RH. Eph/ephrin molecules — a hub for signaling and endocytosis [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(22): 2480–2492.
- [50] Gridley T. Notch signaling in the vasculature [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 92: 277–309.
- [51] Nicoli S, Standley C, Walker P, et al. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis [J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1196–1200.