

基于网络药理学和实验验证探讨雷公藤治疗黑色素瘤的作用机制

江婷婷¹, 赵文文¹, 武香香², 朱红磊³, 曾华辉², 闫敏², 朱鑫^{1*}

1. 河南中医药大学 药学院, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学 中医药科学院, 河南 郑州 450046

3. 河南中医药大学 信息技术学院, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 通过网络药理学和实验验证方法探讨雷公藤治疗黑色素瘤的活性成分、作用靶点及信号通路, 分析雷公藤对黑色素瘤的作用机制。 **方法** 通过 TCMSP 数据库检索雷公藤的有效成分及靶点, 借助 GeneCards、OMIM 数据库获取中药与疾病的交集靶点。采用 Cytoscape 3.7.1 进行拓扑分析, 构建“药物活性成分-疾病靶点”网络图。运用 String 平台构建共同靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络和条形图, 筛选出核心靶点。进行靶点基因富集分析, 完成核心靶标与成分的分子对接。利用 CCK-8 及 qPCR 方法验证核心单体成分对黑色素瘤及治疗靶点的作用。 **结果** 雷公藤有效成分 51 个, 其中最优成分是雷公藤甲素、山柰酚。雷公藤甲素对黑色素瘤细胞具有明显抑制作用, 且显著降低核心治疗靶点蛋白激酶 B1 (Akt1)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)。 **结论** 雷公藤治疗黑色素瘤具有多靶点、多通路的特点, 其中雷公藤甲素是其核心药用成分, 该研究为雷公藤抗黑色素瘤提供了实验依据。

关键词: 雷公藤; 黑色素瘤; 网络药理学; 分子对接; 雷公藤甲素; 山柰酚; 蛋白激酶 B1; 血管内皮生长因子 A

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)01-0034-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.005

Mechanism of *Tripterygium wilfordii* in treatment of melanoma based on network pharmacology and experimentation

JIANG Tingting¹, ZHAO Wenwen¹, WU Xiangxiang², ZHU Honglei³, ZENG Huahui², YAN Min², ZHU Xin¹

1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Academy of Chinese Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. College of Information Technology, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: **Objective** To predict the active ingredients, targets and signaling pathways of *Tripterygium wilfordii* in treatment of melanoma by network pharmacology and experimentation, and to analyze the mechanism of *Tripterygium wilfordii* in treatment of melanoma. **Methods** To search the active components and targets of *Tripterygium wilfordii* from TCMSP database, and the intersection targets of traditional Chinese medicine and diseases were obtained from GeneCards and OMIM databases. Topological analysis was carried out on Cytoscape 3.7.1 to construct the “drug active ingredients - disease targets” network diagram. The interaction network and bar graph of common target protein were constructed with String platform, and the core target was screened out. Target gene enrichment analysis was carried out to complete the molecular docking of core targets and components. CCK8 and qPCR methods were used to verify the effects of core monomer components on melanoma and therapeutic targets. **Results** There were 51 active components of *Tripterygium wilfordii*. The best ingredient are kaempferol and triptolide. It has a significant inhibitory effect on melanoma cells, and significantly reduces the mRNA expression of core therapeutic targets Akt1 and VEGFA. **Conclusion** *Tripterygium wilfordii* has the characteristics of multi-target and multi-pathway in treatment of melanoma, and triptolide is its core medicinal component. This study provides experimental basis for *Tripterygium wilfordii* anti-melanoma.

Key word: *Tripterygium wilfordii*; melanoma; network pharmacology; molecular docking; triptolide; kaempferol; Akt1; VEGFA

收稿日期: 2023-10-21

基金项目: 河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)项目(222301420060); 河南省自然科学基金-优秀青年科学基金项目(212300410057)

作者简介: 江婷婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物化学研究。E-mail: 2291660740@qq.com

*通信作者: 朱鑫, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物化学研究。E-mail: 13603869261@139.com

黑色素瘤通常是指恶性黑色素瘤是黑色素细胞来源的一种高度恶性的肿瘤,多发生于皮肤,也可见于黏膜和内脏,其发病率占皮肤肿瘤第 3 位^[1]。目前关于预防和治疗黑色素瘤的药物比较匮乏,且效果不理想,5 年生存率不足 40%^[2]。临床上治疗主要以手术切除为主,辅助放疗、化疗、免疫疗法以及靶向治疗^[3-4]。这些方法效果和安全性尚待进一步考察,且治疗费用昂贵^[5-6]。因此,近年来人们更加关注从天然植物中寻找预防和治疗黑色素瘤的新途径。

传统中医药理论认为,黑色素瘤属中医“黑疔”“恶疮”“疔疽”等范畴,在临床治疗中以“扶正祛邪、清热解毒、活血化瘀”为主要治则^[7]。雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.f. 为卫矛科木本植物,具有清热解毒、祛风除湿、活血通络、消肿止痛等功效^[8]。雷公藤甲素是雷公藤的主要生物活性成分之一,具有有效的抗癌活性^[9],用于治疗炎症、自身免疫和恶性疾病已有数百年历史^[10]。雷公藤甲素抗黑色素瘤已有文献报道^[11],称雷公藤甲素对黑色素瘤细胞具有抗增殖、抗侵袭和促凋亡的作用。杨羽等^[12]研究表明雷公藤甲素通过抑制趋化因子配体 2 (CCL2)/趋化因子 C-C-基元受体 2 (CCR2) 信号通路调节黑色素瘤细胞的增殖、凋亡和免疫逃逸。然而,目前关于雷公藤甲素治疗黑色素瘤的研究仍处于初级阶段,其潜在靶点及作用机制有待进一步阐明。

中药成分多且复杂,呈现出多组分、多靶点的特征,网络药理学研究思路与中医药多成分、多靶标、系统调控的理念相一致,其整体性以及注重药物-疾病-靶点相互作用关系的特点与未来中药的发展趋势相吻合^[13]。本研究基于网络药理学与分子对接技术筛选雷公藤活性成分治疗黑色素瘤的相关靶点和通路,并将筛选后的活性成分与靶蛋白进行分子对接,采用体外实验验证雷公藤调控相关通路关键靶点作用机制,为探索雷公藤治疗黑色素瘤提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 雷公藤活性成分与靶点筛选

利用中药系统数据库及分析平台 (TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>),检索雷公藤的所有化学成分,以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选条件,得到雷公藤的活性成分和靶点。

1.2 雷公藤作用靶点收集和疾病相关靶点的收集

通过 TCMSP 数据库查找雷公藤活性成分对应潜在靶点。利用 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库,输入 “melanoma” 为关键词进行搜索,去重后,使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点处理后得到标准名称。

1.3 “药物活性成分-疾病靶点”调控网络构建

将 1.2 项下获取的药物活性靶点和疾病靶点进行 Venny 2.1 软件进行分析,将其交集靶点再用 Perl 脚本处理,得出的 Network、MolLists、Type 文件导入 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化,构建出“药物活性成分-疾病靶点”网络图。

1.4 蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建及核心靶点筛选

利用 String 数据库,进行 PPI 分析。以网络中各靶基因的节点 degree 值为指标,筛选出网络中的核心蛋白质靶标, R 软件绘制靶点条形图。

1.5 富集功能分析

基于 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>),以 $P < 0.05$ 为筛选条件,对交集靶点进行基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。利用微生信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 将 GO 及 KEGG 通路富集结果绘制成柱状图和气泡图。

1.6 主要活性成分-核心靶点分子对接

通过蛋白质数据库 PDB 和 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载筛选得到的成分和靶蛋白结构,采用 AutoDockTools 进行分子对接,使用 PyMOL 进行可视化。根据以往文献报道,选取结合能最小的对接模型。

1.7 实验验证

1.7.1 细胞 黑色素瘤 B16-F1 细胞,购自于武汉普诺赛有限公司。

1.7.2 试剂与仪器 雷公藤甲素 (质量分数 99%,批号 LGTJS20180126,西安昊轩公司); RPMI1640 培养基 (批号: 31800,北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清 (批号 42Q9281K,美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (批号 CA1210,北京索莱宝科技有限公司); Trizol (批号 R1100,北京索莱宝科技有限公司); BeyoRTTMcDNA 第一链合成试剂盒 (批号 D7178M,上海碧云天生物技术有限公司); PCR 引物 (苏州金唯智生物科技有限公司); Green PCR

Master Mix (批号 A25742, 美国 Thermo 公司)。

3111 型恒温培养箱 (赛默飞世尔科技有限公司); TG16-WS 型离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); SW-CJ-2F 型超净台 (苏州苏洁净化公司); AL204 型精密电子天平 (梅特勒-托利多上海有限公司); 1510-02820C 型酶标仪 (美国 Thermo 公司); TS100 型倒置显微镜 (日本尼康公司); A00947 型 RNA 逆转录仪 (美国 Thermo 公司); QuantStudio 7 Flex 实时荧光 PCR 仪 (美国 Thermo 公司)。

1.7.3 B16-F1 细胞毒性实验 B16-F1 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 以 2.5×10^3 个/孔, 接种 96 孔板, 置于 37 °C 培养箱过夜, 每孔分别加入不同质量浓度 (0、2.5、5、10、15、20、25、30 ng/mL) 的雷公藤甲素 100 μ L 作用细胞 24 h, 按 CCK-8 试剂盒说明书进行操作, 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞活力, 另设对照组 (无血清培养基)。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

1.7.4 荧光定量 PCR 检测蛋白激酶 B1 (Akt1)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) mRNA 的表达 将细胞分为对照组及不同质量浓度 (10、11.36、15 ng/mL) 雷公藤甲素处理组, 用 Trizol 试剂提取各组 B16-F1 细胞总 RNA, 按照试剂盒操作步骤进行逆转录合成 cDNA, PCR 扩增。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参, 再用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法求算目的基因的表达式, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因	上游序列 (5'→3')	下游序列 (5'→3')
GAPDH	AGGTCGGTGTGAAC GGATTG	TGTAGACCATGTA GTTGAGGTCA
Akt1	ATGAACGACGTAGCC ATTGTG	TTGTAGCCAATAA AGGTGCCAT
VEGFA	GATCTGCTCCCTCCC TCTACA	TTGACCCTTTCCCT TTCCTCG

1.7.5 统计学方法 使用 SPSS 26.0 软件进行实验数据统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 雷公藤活性成分及治疗黑色素瘤潜在靶点

通过 TCMSP 数据库检索, 筛选出雷公藤 51 种成分, 成分靶点共 121 个。根据 degree 值排名, 其

中主要活性成分 7 个, 见表 2。

表 2 雷公藤主要活性成分基本信息

Table 2 Basic information of main active ingredients of *Tripterygium wilfordii*

编号	化合物名称	OB/%	DL	degree
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	44
MOL003187	triptolide	51.29	0.68	32
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52	27
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75	22
MOL003231	triptoditerpenic acid B	40.02	0.36	18
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	18
MOL003229	triptinin B	34.73	0.32	16

2.2 药物-疾病交集靶点获取

在 GeneCards 和 OMIM 疾病数据库中检索有关黑色素瘤的疾病靶点, 去重后, 得疾病相关靶点 7 615 个。利用 Venny 分析工具对雷公藤靶点和黑色素瘤靶点取交集, 其中与黑色素瘤相关的靶点有 100 个, 见图 1。

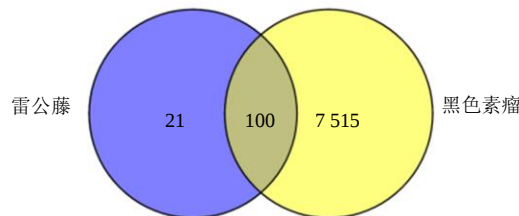


图 1 雷公藤与黑色素瘤重合的靶点韦恩图

Fig. 1 Veen diagram of the overlap of *Tripterygium wilfordii* and melanoma

2.3 “药物活性成分-疾病靶点”网络构建

将交集靶点和筛选的药物活性成分, 用 Cytoscape 软件构建“药物活性成分-疾病靶点”网络, 见图 2。药物活性成分中 degree 值排前 2 位的分别是山柰酚 (degree = 44)、雷公藤甲素 (degree = 32)。

2.4 PPI 网络构建及核心靶点筛选

将交集靶点导入 String 数据库进行 PPI 分析。如图 3 所示, PPI 含有 100 个靶蛋白和 1 092 条互作边。其关键靶点包括 Akt1、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、血管内皮生长因子 2 (VEGF2)、AP-1 转录因子亚基 (JUN)、信号传导和转录激活蛋白 3 (STAT3) 等, 可能是雷公藤治疗黑色素瘤的关键靶点, 绘制成靶点条形图, 见图 4。

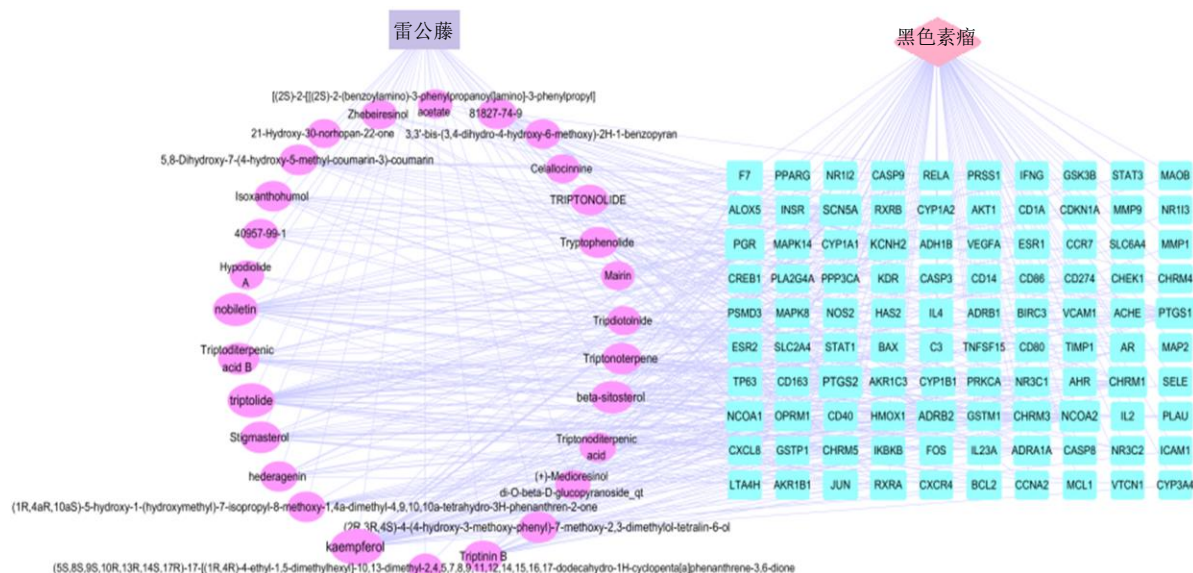


图 2 雷公藤活性成分 - 疾病靶点图

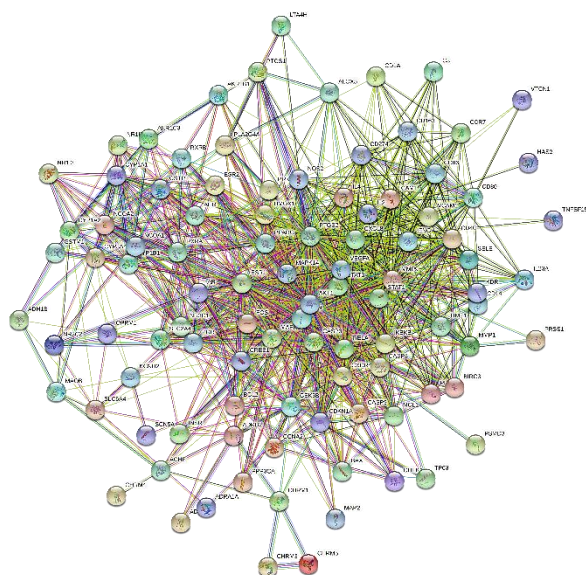
Fig. 2 Active ingredients of *Tripterygium wilfordii* - disease target map

图 3 PPI 网络图的构建

Fig. 3 Construction of the PPI network diagram

2.5 GO 和 KEGG 通路富集分析

在 GO 富集分析中, 富集到 436 条生物过程 (BP)、52 条细胞组成 (CC)、102 条分子功能 (MF) 条目。以 $P < 0.05$ 为筛选条件。取前 10 个 GO 条目绘制条形图, 见图 5。

根据 DAVID 筛得到 KEGG 通路 147 条, 根据 P 值排序绘制排名前 20 位的 KEGG 气泡图, 见图 6。可预测雷公藤对黑色素瘤的治疗作用主要分布在癌症通路、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) /Akt、肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素 (IL) -17、VEGF 等信号通路。

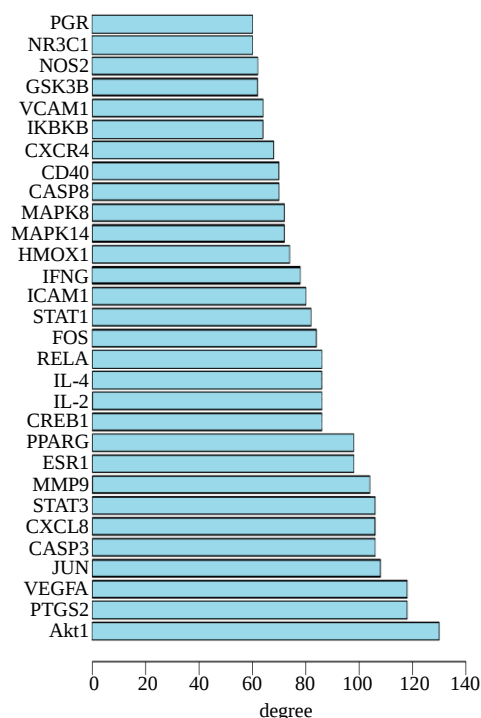


图 4 核心靶点条形图

Fig. 4 Bar plots of core targets

2.6 分子对接结果

分子对接结果显示山柰酚、雷公藤甲素与 Akt1、PTGS2、VEGFA 核心靶点结合能均小于 -5 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.4 \text{ J}$), 表现出较强的结合活性, 见表 3。提示这 2 个活性成分在雷公藤治疗黑色素瘤中起着较为重要的作用, 进一步通过 PyMol 软件对接结果进行可视化, 见图 7。

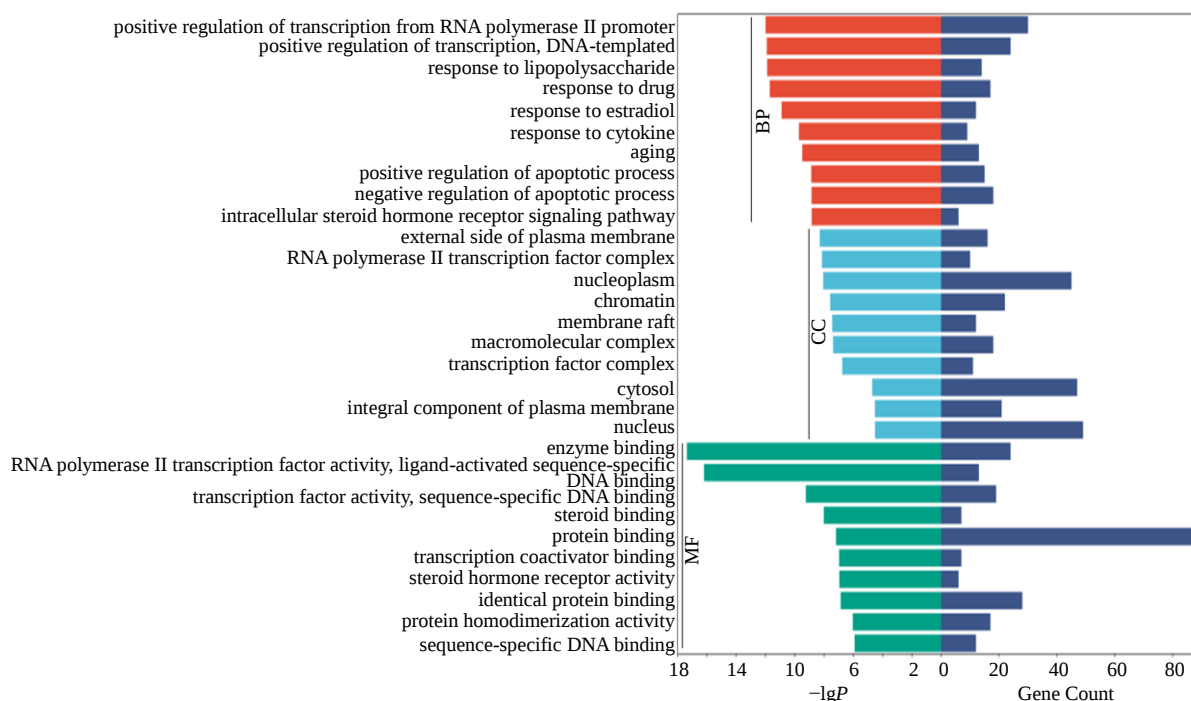


图 5 GO 功能富集分析
Fig. 5 GO functional enrichment analysis

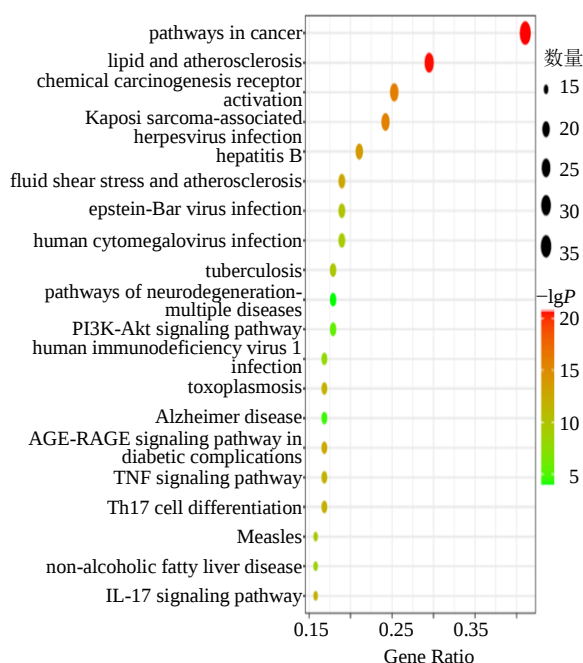


图 6 KEGG 富集分析气泡图
Fig. 6 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis

2.7 实验验证结果

2.7.1 细胞毒性实验 结果显示, 雷公藤甲素能够抑制黑色素瘤细胞的生长, 并呈浓度相关性, IC_{50} 为 11.36 ng/mL, 见图 8。

表 3 山柰酚和雷公藤甲素抗黑色素瘤关键靶点结合能
Table 3 Prediction of binding energy of key targets of kaempferol and triptolide against melanoma

靶点名称	PDB ID	结合能/(kcal mol ⁻¹)	
		山柰酚	雷公藤甲素
Akt1	1UNQ	-5.9	-6.7
PTGS2	5F19	-9.0	-9.1
VEGFA	1MKK	-7.2	-7.8

2.7.2 荧光定量 PCR 检测 *Akt1*、*VEGFA* mRNA 的表达 通过实时 qPCR 结果可知给予不同质量浓度 10、11.36、15 ng/mL 雷公藤甲素后, *Akt1*、*VEGFA* mRNA 表达明显低于对照组 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 9。

3 讨论

本研究通过网络药理学研究, 构建出“药物活性成分-靶点”网络图, 进一步明确化学成分与靶点之间的相互作用关系。其中活性成分排在前 2 位的是山柰酚和雷公藤甲素。因山柰酚在雷公藤中的成分含量较低, 不能真正发挥中药在临床上的药用价值, 故选取雷公藤甲素作为抗黑色素瘤的主要成分^[14]。已有文献表明雷公藤甲素能抑制黑色素瘤细胞的增殖和侵袭^[15]。

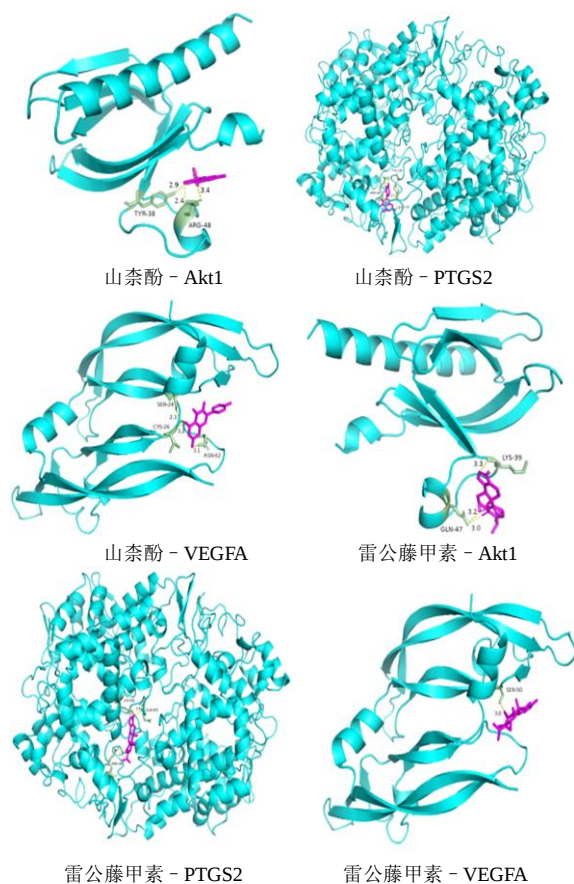
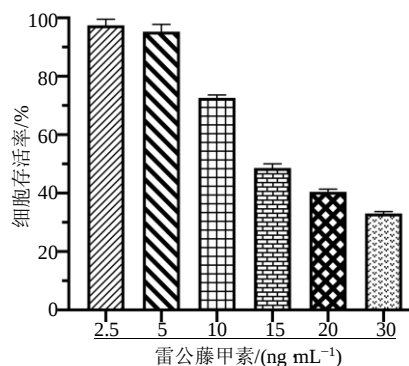
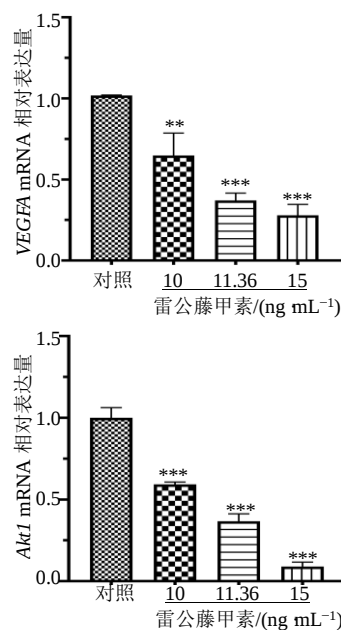


图 7 分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram

图 8 雷公藤甲素对 B16-F1 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)Fig. 8 Effect of triptolide on cytotoxicity of B16-F1 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

PPI 网络筛选出核心靶点为 Akt1、PTGS2、VEGFA、JUN 等靶点参与多个 BP, 如炎症、细胞增殖和凋亡等。KEGG 富集结果表明, 雷公藤抗黑色素瘤的作用可能与癌症通路、PI3K/Akt、TNF、IL-17、VEGF 等信号通路有关。并且与上述核心靶标存在一定的联系。有研究表明 PI3K/Akt 信号通路广泛参与调控细胞增殖、凋亡以及细胞周期等生理



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 9 雷公藤甲素对 Akt1、VEGFA mRNA 的表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effect of triptolide on expression of Akt1 and VEGFA mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

病理活动, 该通路的失调与黑色素瘤的发生发展密切相关^[16]。VEGFA 是一种具有高度特异性, 并可促进血管生成的因子, 通过与血管内皮细胞上的受体结合发挥作用^[17], 抑制 VEGF 表达能够减少新生血管的生成, 从而抑制细胞增殖与侵袭能力^[18]。有文献报道, VEGFA/VEGFR1 信号通路可作为预防黑色素瘤侵袭和转移的治疗靶点^[19]。

分子对接结果表明, 雷公藤甲素与 Akt1、PTGS2、VEGFA 这 3 个靶蛋白有较强的结合活性, 借助氢键等分子间作用力产生较稳定构象。体外细胞毒性实验和 Real-time PCR 实验证明了雷公藤甲素呈剂量相关性降低 B16-F1 细胞中血管内皮生长因子 VEGFA 和 Akt1 的表达, 抑制 B16-F1 细胞增殖, 发挥抗黑色素瘤作用。

综上所述, 本文通过网络药理学揭示了雷公藤治疗黑色素瘤的潜在机制, 证明了雷公藤多靶点、多通路治疗黑色素瘤, 为雷公藤治疗黑色素瘤后续实验研究和临床研究提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Mastoraki A, Schizas D, Ntella V, et al. Clinical evidence,

- diagnostic approach and challenging therapeutic modalities for malignant melanoma of the anorectum [J]. *ANZ J Surg*, 2021, 91(3): 276-281.
- [2] Robert, C, Grob, J J, Stroyakovskiy, D, *et al.* Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2019; 381(7): 626-636.
- [3] 高天文, 孙东杰, 李春英, 等. 中国西部两医院 1 905 例皮肤恶性肿瘤回顾分析 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2004, 36(5): 469-472.
- [4] 张竞之, 邓波, 江小梨, 等. BRAF 在 10-姜酚抗黑色素瘤中作用的分子模拟及实验研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(12): 2166-2171.
- [5] McQuade, J L, Daniel, C R, Hess, K R, *et al.* Association of body-mass index and outcomes in patients with metastatic melanoma treated with targeted therapy, immunotherapy, or chemotherapy: A retrospective, multicohort analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(3): 310-322.
- [6] 兰楠, 吕志阳, 周雨晴, 等. 秦皮素通过下调 p70S6K 抑制人黑色素瘤细胞增殖、迁移和侵袭研究 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6254-6260.
- [7] 谢超群, 苗秀明, 宋业强. 黑色素瘤的中西医研究进展 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(6): 99-102.
- [8] 黎曼欣, 崔夏莲, 黄冬冬, 等. 雷公藤化学成分及其黄烷醇抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6220-6227.
- [9] Noel P, Von Hoff D D, Saluja A K, *et al.* Triptolide and its derivatives as cancer therapies [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(5): 327-341.
- [10] Chen S R, Dai Y, Zhao J, *et al.* A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook F. [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 104.
- [11] Gu Y, Du Y, Jiang L, *et al.* $\alpha v \beta 3$ integrin-specific exosomes engineered with cyclopeptide for targeted delivery of triptolide against malignant melanoma [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 384.
- [12] 杨羽, 黎官印, 陈颖, 等. 雷公藤甲素通过抑制 CCL2-CCR2 信号通路调节黑色素瘤细胞的增殖、凋亡和免疫逃避 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2023, 26(5): 449-455.
- [13] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [14] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.
- [15] 王艳云, 高明敏, 姚丽, 等. 雷公藤甲素对恶性黑色素瘤 A375 细胞 EMT 通路及侵袭相关蛋白表达的影响 [J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(7): 1050-1053.
- [16] Chamcheu J C, Roy T, Uddin M B, *et al.* Role and therapeutic targeting of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in skin cancer: A review of current status and future trends on natural and synthetic agents therapy [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 803-803.
- [17] Bhattacharya R, Ye, X C, Wang R, *et al.* Intracrine VEGF signaling mediates the activity of prosurvival pathways in human colorectal cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(10): 3014-3024.
- [18] Wan X, Zhu Y, Zhang L, *et al.* Gefitinib inhibits malignant melanoma cells through the VEGF/AKT signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 7351-7355.
- [19] Koizumi K, Shintani T, Hayashido Y, *et al.* VEGF-A promotes the motility of human melanoma cells through the VEGFR1-PI3K/Akt signaling pathway [J]. *In Vitro Cell Dev Anim*, 2022, 58(8): 758-770.

【责任编辑 高源】