

新绿原酸抑制人宫颈癌 HeLa 细胞迁移的实验研究

陈锡强^{1, 2, 3}, 张云^{1, 2, 3}, 刘可春^{1, 2, 3*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

2. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

3. 山东省生物检测技术工程实验室, 山东 济南 250103

摘要:目的 考察新绿原酸对宫颈癌 HeLa 细胞体外迁移模型和斑马鱼移植瘤模型的影响。方法 MTT 法检测新绿原酸(20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$)对 HeLa 细胞增殖的作用;应用宫颈癌细胞 HeLa 划痕愈合模型和 Transwell 实验考察新绿原酸(28、56、113 $\mu\text{mol/L}$)对体外迁移作用的影响;同时利用构建的绿色荧光蛋白(GFP)的 HeLa 细胞系建立斑马鱼移植瘤模型,考察新绿原酸(56、113、226 $\mu\text{mol/L}$)对体内移植瘤模型细胞迁移的作用;Western blotting 法检测新绿原酸对内皮生长因子(EGF)诱导的 HeLa 细胞中表皮生长因子受体(EGFR)、p-EGFR 蛋白表达的影响。结果 MTT 结果显示,新绿原酸在 160 $\mu\text{mol/L}$ 及以下浓度对 HeLa 细胞增殖无明显影响;与对照组比较,56、113 $\mu\text{mol/L}$ 新绿原酸显著抑制划痕愈合,抑制率分别为 49.3% ($P < 0.05$) 和 64.1% ($P < 0.01$);Transwell 实验结果提示,113 $\mu\text{mol/L}$ 新绿原酸具有显著抑制 HeLa 细胞向下层迁移的作用 ($P < 0.05$);与模型组比较,113、226 $\mu\text{mol/L}$ 新绿原酸可显著减少斑马鱼移植瘤模型的 HeLa 细胞的迁移面积 ($P < 0.05, 0.01$);Western blotting 结果显示,与 EGF 组比较,新绿原酸对 EGFR 表达和磷酸化有明显抑制作用,56、113 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组差异显著 ($P < 0.01$)。结论 在未影响 HeLa 细胞增殖的浓度下,新绿原酸具有抑制宫颈癌 HeLa 细胞迁移的作用,其作用机制与抑制 EGFR 的表达有关。

关键词:新绿原酸;肿瘤迁移;宫颈癌;斑马鱼;表皮生长因子受体

中图分类号: R285.5, R737.3, R332 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)08-1588-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.08.003

Study of 5-caffeoylquinic acid inhibit human cervical cancer HeLa cell line migration

CHEN Xiqiang^{1, 2, 3}, ZHANG Yun^{1, 2, 3}, LIU Kechun^{1, 2, 3}

1. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

2. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103, China

3. Shandong Provincial Engineering Laboratory for Biological Testing Technology, Jinan 250103, China

Abstract: Objective To investigate the effect of 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) on migration of human cervical cancer HeLa cells. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of 5-CQA (20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol/L}$) on the proliferation of HeLa cells. The wound healing model of HeLa cells and Transwell were used to detect the migration of 5-CQA (28, 56, 113 $\mu\text{mol/L}$) *in vitro*. At the same time, zebrafish xenograft tumor model was established by using the constructed HeLa cell line of green fluorescent protein (GFP), and the migration of 5-CQA (56, 113, 226 $\mu\text{mol/L}$) was detected. Western blotting was used to detect the effect of 5-CQA on the expression of p-epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR protein in HeLa cells induced by EGF. **Results** MTT results showed that there was no significant effect on the proliferation of HeLa cells of 5-CQA at the concentration of 160 $\mu\text{mol/L}$ or below. Compared with control group, 56, 113 $\mu\text{mol/L}$ 5-CQA significantly inhibited wound healing with inhibition rates of 49.3% ($P < 0.05$) and 64.1% ($P < 0.01$), respectively. Transwell results showed that 113 $\mu\text{mol/L}$ 5-CQA significantly inhibited the migration of

收稿日期: 2021-04-21

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1707300);山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY020905);齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD08)

第一作者:陈锡强(1972—),男,副研究员,博士,研究方向为药理学。E-mail:cxqq@sian.com.

*通信作者:刘可春(1964—),男,研究员,博士,研究方向为天然药物研发。E-mail:hliukch@sdsas.org

HeLa cells ($P < 0.05$). Compared with model group, 113, 226 $\mu\text{mol/L}$ 5-CQA significantly reduced the migration area of HeLa cells ($P < 0.05$, 0.01). Western blotting results showed that compared with EGF group, 5-CQA (56 and 113 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited EGFR expression and phosphorylation ($P < 0.01$). **Conclusions** 5-CQA can inhibit cervical cancer HeLa cell migration by blocking EGFR expression.

Key words: 5-caffeoylquinic acid; cancer migration; cervical cancer; zebrafish; epidermal growth factor receptor

肿瘤转移是一个多因素、渐进发展的过程,肿瘤转移扩散也是恶性肿瘤的重要标志之一,由于肿瘤转移的过程是复杂和难以预见的,重要器官肿瘤转移灶往往是引起肿瘤患者死亡的主要因素^[1]。据统计,约30%的肿瘤患者去就诊时就已经有明显的肿瘤转移病灶,超过90%的癌症患者死于肿瘤转移^[2]。已知的乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌和黑色素瘤等易转移癌症是目前研究的热点。原位癌细胞依靠直接蔓延、淋巴转移、血液转移和种植模式实现转移,形成继发性肿瘤,在迁移的过程中,细胞的侵袭能力和趋化运动起重要的作用^[3]。肿瘤的选择性转移相关的介质分子主要包括3类:生长因子、黏附分子和化学趋化因子,表皮生长因子受体(EGFR)是酪氨酸激酶受体2(ErbB)基因家族的成员之一,通过激活下游的信号通路,EGFR可以促进细胞的增殖、分化和迁移^[4],EGFR突变是恶性肿瘤最常见的侵袭靶点之一,目前针对EGFR突变的抑制剂已经成为非小细胞肺癌和乳腺癌的首选靶向治疗药物,其中EGFR抗体类药物已应用于临床。

研究发现,内皮形成因子/抑制血管生成抑制剂对多种肿瘤的迁移具有抑制作用。其中人参皂苷、紫杉醇等天然产物成为了研究的热点^[5-6]。新绿原酸是分布广泛的天然产物成分之一,研究发现其具有广泛抗肿瘤药理活性,包括抗氧化、抗炎和抑制血管生成等^[7-8],并且有研究者发现新绿原酸具有联合应用抗肿瘤的潜力,它可通过抑制细胞外调节蛋白激酶(ERK)增强5-氟尿嘧啶(5-FU)对肝癌细胞的增殖抑制作用^[9]。但是新绿原酸在肿瘤迁移方面的影响还未见研究报道,本课题组利用体外经典迁移模型和斑马鱼移植瘤模型,研究新绿原酸对宫颈癌HeLa细胞迁移的影响。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

新绿原酸(质量分数 $\geq 96.5\%$)购自南通飞宇生物科技有限公司;紫杉醇(HY-B0015, 50 mg/支)、厄洛替尼(erlotinib, HY-50896, 100 mg/支)和PTK787(HY-10203, 100 mg/支)均购自美国MCE公司;DMEM高糖培养基、新鲜胎牛血清(FBS)和双

抗($\times 100$)均购自美国GIBCO公司;脱膜剂(链霉菌蛋白酶E, Pronase E)和麻醉剂(Tricaine, MS222)购自北京索莱宝公司。内皮生长因子(EGF, P00033, 50 $\mu\text{g}/\text{支}$)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 主要仪器

Transwell小室板购自默克密理博(中国);Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo公司);超净工作台由苏州安泰净化消毒设备厂提供;Thermo二氧化碳细胞培养箱(#3111)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;IX51倒置显微镜、体视荧光显微镜SZX 61和激光共聚焦显微镜FV1000型购自奥林巴斯(中国)有限公司;微量注射仪ZGENEBIOPCO 1500购自力钧生物科技有限公司;HPG 280BX光照培养箱由哈尔滨东联电子科技公司提供;斑马鱼养殖饲养设备来自北京爱生科技公司。

1.3 斑马鱼及细胞

野生型AB品系斑马鱼为山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。宫颈癌HeLa细胞株及构建的含GFP的HeLa细胞株由聊城大学严守升博士提供。

2 方法

2.1 新绿原酸对HeLa细胞增殖的影响

取对数生长期的HeLa细胞,用含10% FBS的DMEM细胞培养基调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,每孔100 μL 接种于48孔板,置于 CO_2 细胞培养箱中培养24 h后,分别设置对照组和新绿原酸20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组,每组设置6个复孔。继续培养48 h后,加入MTT溶液20 μL (5 mg/mL), 37°C 继续孵育2 h后终止培养,移除培养基,加入DMSO置于脱色摇床20 min,吸取上清移入96孔板,全自动酶标仪测定波长490 nm处的吸光度(A)值。

2.2 新绿原酸对细胞划痕修复的影响

参照Chen等^[10]方法并加以改进,收集对数生长期HeLa细胞均匀接种于12孔板中;待细胞长至完全融合后,用1 mL tip枪头用力均匀地在每孔单层细胞中央划一道痕,且沿划痕边缘等距离间隔做标记,以便检测;PBS冲洗2次,设置对照组、PTK787(阳性药, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组和新绿原酸28、56、

113 $\mu\text{mol/L}$ 组, 药物处理 24 h; 于倒置显微镜 IPPWIN60 下拍照, 用 Image J 软件处理生长面积。

2.3 新绿原酸对 Transwell 迁移模型的影响

参照 Valster 等^[11]方法进行并加以改进, 在无菌条件下, 取 6 孔板置于灭菌工作台上, 各孔加入 2 mL 含 10% FBS+双抗的 DMEM 培养基, 分别加入终浓度为 0、28、56、113 $\mu\text{mol/L}$ 的新绿原酸, 将无菌的 millipore Transwell 上室置于 6 孔板各孔上, 各个上室加入浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的 HeLa 细胞 800 μL 。常规培养 24 h 后取出 Transwell 小室, 用棉签擦去上室膜表面未穿过的细胞, 4% 多聚甲醛固定小室 20 min, 然后使用 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 冲洗 2 次, 将小室的下表面置于光学显微镜下进行观察计数并拍照, 并利用 Image J 软件计算细胞数量, 随机计算 5 个视野中细胞数平均值。

2.4 Western blotting 法检测 EGFR 表达

取对数生长期的 HeLa 细胞, 以 $4 \times 10^5/\text{孔}$ 浓度接种至 6 孔板, 置于 CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后, 分别设置对照组、EGF (10 ng/mL) 组、厄洛替尼 (阳性药) + EGF 组和新绿原酸 28、56、113 $\mu\text{mol/L}$ + EGF 组, EGF 与药物同时孵育 24 h。

药物处理后的 HeLa 细胞经胰酶消化后, 低温 3 000 r/min 离心 3 min 后, 弃上清, 用冷的 RIPA 裂解液处理 40 min, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 利用 BCA 法检测总蛋白浓度, 上清液加入 loading buffer 煮沸变性, 取 25 μg 总蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转 NC 膜后, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 滴加 p-EGFR、EGFR、 β -actin 一抗后置恒温 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 洗膜后滴加山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1 h, 洗膜后滴加 ECL 显色剂显影; 以 β -actin 为内参, 使用软件 Image J 分析蛋白条带灰度, 通过条带灰度值半定量目标蛋白表达量。

2.5 斑马鱼移植瘤模型

雌雄斑马鱼饲养方法和移植瘤的造模方法参照文献方法^[12-13]。HeLa-GFP 细胞培养于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中, 无菌条件下在操作台将培养瓶中 HeLa-GFP 细胞除去培养基, PBS 清洗 2 次后, 加入胰酶消化, 加入培养基终止并离心后换新的培养基, PBS 清洗 2 次后, 加入无血清培养基复悬, 镜下调整细胞密度达到 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。同时在斑马鱼受精卵发育 48 h 时, 在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎, 移入 6 孔培养板中, 并进行显微注射, 注射体积约 5 nL, 6 h 后在荧光倒置显微镜下挑选注射部位

一致的斑马鱼, 并加药处理每孔 10~15 枚, 设置下列分组: 模型组、紫杉醇 (8 $\mu\text{mol/L}$) 组、新绿原酸 56、113、226 $\mu\text{mol/L}$ 组, 然后置于光照培养箱 (28 $^\circ\text{C}$) 让胚胎继续发育。48 h 后, 各组胚胎麻醉后采用激光共聚焦显微镜观察, 拍照并应用 Image J 软件统计荧光面积。

2.6 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 7.0 统计软件进行统计处理, 组间比较采用 *t* 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 新绿原酸对 HeLa 细胞株增殖的影响

MTT 结果显示, 与对照组比较, 经过新绿原酸处理 48 h 后的细胞相对存活率呈下降趋势, 在 320 $\mu\text{mol/L}$ 时差异显著 ($P < 0.05$), 在 160 $\mu\text{mol/L}$ 及以下浓度对 HeLa 细胞增殖无明显影响。见图 1。

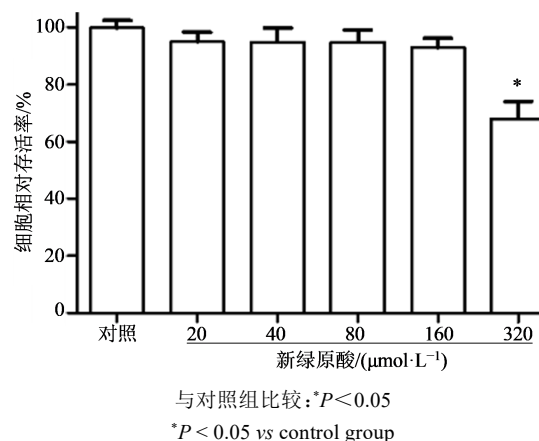


图1 新绿原酸对人宫颈癌HeLa细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 1 Effect of 5-CQA on proliferation of human cervical cancer HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 新绿原酸对划痕愈合模型的影响

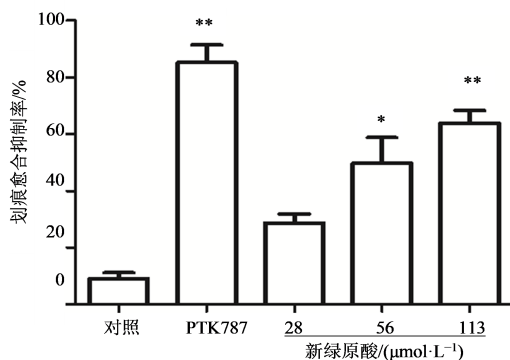
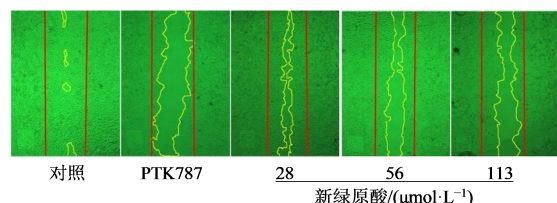
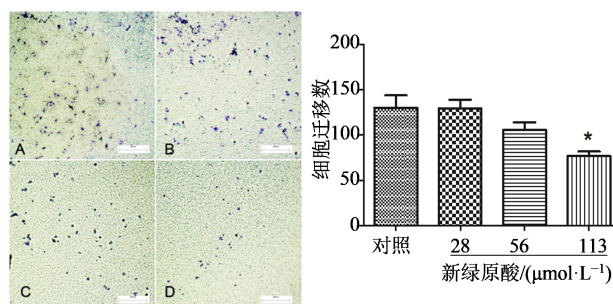
与对照组比较, 48 h 对照组划痕基本愈合, PTK787 阳性对照组能够显著抑制划痕愈合 ($P < 0.01$), 抑制率均值在 85.3%; 新绿原酸 56、113 $\mu\text{mol/L}$ 组显著抑制划痕愈合的作用, 抑制率分别为 49.3% ($P < 0.05$) 和 64.1% ($P < 0.01$), 具有明显浓度相关性。结果见图 2。

3.3 新绿原酸对 Transwell 模型的影响

对照组出现明显紫色细胞迁移现象, 新绿原酸处理后迁移细胞数量出现递减, 呈浓度相关性, 与对照组比较, 113 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞迁移数量显著减少 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

3.4 新绿原酸对 EGFR 表达和磷酸化的影响

与对照组比较, EGF 可明显促进 EGFR 表达和

图2 新绿原酸对划痕愈合模型的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 Effect of 5-CQA on wounding healing assay($\bar{x} \pm s, n=3$)A-对照组; B、C、D-新绿原酸 28、56、113 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$ A-control group; B, C, D-neochlorogenic acid 28, 56, 113 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; * $P < 0.05$ vs control group图3 新绿原酸对Transwell模型HeLa细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 3 Effect of 5-CQA on migration of HeLa cells in Transwell model($\bar{x} \pm s, n=5$)

磷酸化;厄洛替尼是一种特异性表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂,与EGF组比较,厄洛替尼可明显抑制EGFR表达和磷酸化($P < 0.001$);新绿原酸对EGFR表达和磷酸化有明显抑制作用,56、113 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组差异显著($P < 0.01$),且呈明显的浓度相关性。结果见图4。

3.5 新绿原酸对斑马鱼移植瘤模型HeLa细胞迁移的影响

图5结果显示,与模型组比较,新绿原酸各组均未出现明显的形态异常。模型组HeLa-GFP细胞可以扩散至整个卵黄囊区域,荧光强

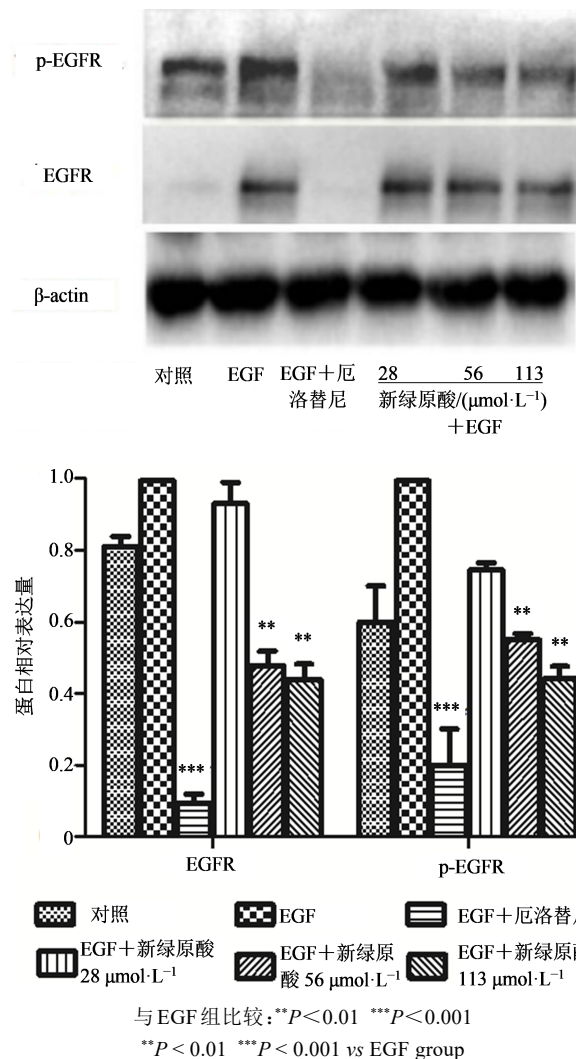
与EGF组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs EGF group

图4 新绿原酸对EGFR蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of 5-CQA on EGFR expression

度均匀;与模型组比较,经紫杉醇处理后,荧光集中在卵周系,荧光面积显著下降($P < 0.01$);经绿原酸处理后,卵黄囊区域荧光面积出现缩小趋势,呈现明显的浓度相关性,113、226 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组差异显著($P < 0.05$ 、0.01)。

4 讨论

新绿原酸属于咖啡酸奎宁酸系列化合物中的一个,在多种天然植物中均含有该系列化合物^[14],该类化合物具有抗肿瘤活性,但对新绿原酸的抑制肿瘤细胞迁移的作用未见报道。本研究利用斑马鱼移植瘤模型,发现新绿原酸具有抑制肿瘤细胞迁移的活性,研究结果显示,新绿原酸对于宫颈癌HeLa细胞株的体内和体外迁移作用均有明显的抑制作用,提示抑制肿瘤细胞迁移发生也是其抗肿瘤活性之一。

EGFR是内皮细胞中EGF诱导的信号转导的主要受体,在内皮细胞参与血管增殖和迁移步骤中起

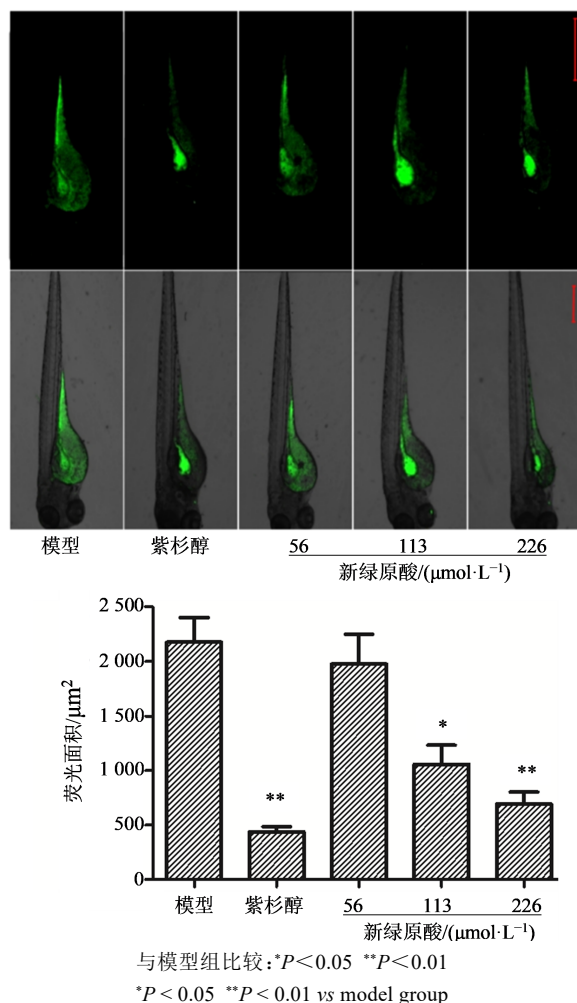


图5 新绿原酸对HeLa-GFP斑马鱼移植瘤模型的影响($\bar{x} \pm s$)
Fig. 5 Effect of 5-CQA on HeLa-GFP xenograft zebrafish assay ($\bar{x} \pm s$)

重要的调控作用^[15-16]。绿原酸类化合物是由咖啡酸与奎尼酸形成的缩酚酸,近年研究发现,咖啡酸具有抑制血管生成和间接抑制血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)表达的作用^[17],本研究首次报道,新绿原酸抑制EGFR表达。在本移植瘤模型研究中,新绿原酸能够明显抑制移植瘤斑马鱼模型人源宫颈癌细胞在体内迁移,说明新绿原酸具有抑制迁移的作用,并且作用与直接或者间接抑制EGFR的表达有关。

虽然新绿原酸抗肿瘤活性一直是世界各国研究人员的热点,但已有绿原酸类化合物抗肿瘤研究集中在新靶点和体外实验^[18-19],在体研究的实验结果少有报道,而使人质疑绿原酸的抗肿瘤活性。本课题组利用斑马鱼模型的可视化和高通量特性,完成了从咖啡酸奎宁酸系列化合物的初筛到斑马鱼模型的体内研究^[20],表明新绿原酸可以作为防治继

发性宫颈癌的候选化合物之一。虽然斑马鱼模型具有经济快捷评价的优点,但是移植瘤在斑马鱼体内的扩散为三维立体结构,本研究以移植瘤扩散面积为考察指标具有一定的研究局限性,进一步研究如何建立多层扫描荧光三维模型评价体系,以及在此条件下考察新绿原酸抑制肿瘤扩散的活性已经成为亟待开展的新课题。

咖啡酸奎宁酸类成分是多种药食两用的中药材中主要活性成分,这类成分通过诱导凋亡、抗氧化和抗炎等多种活性发挥抗肿瘤作用,在肿瘤的发生和发展阶段都起到积极防治作用,但是如何科学评价天然产物抗肿瘤活性,为提高肿瘤的防治作用提供新的实验依据,并为临床应用提供了新的研究思路成为急需解决的问题,可以肯定的是斑马鱼疾病模型的使用会对这个问题的解决提供有益工具。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nguyen D X, Bos P D, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4): 274-284.
- [2] 王爱云, 韦忠红, 钱程, 等. "已病防变"——调控肿瘤转移前微环境防止肿瘤转移 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5968-5972.
Wang A Y, Zhong H W, Cheng Q, et al. "Preventing transform when sickness" --Regulating pre-metastasis niche to prevent tumor metastasis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(24): 5968-5972.
- [3] 汪麟, 苏爱香. 趋化因子CXCL1与肿瘤关系的研究进展 [J]. 国际遗传学杂志, 2018, 41(5): 398-402.
Wang L, Su A X. Research progress in the relationship between chemokine CXCL1 and tumor [J]. Int Gene, 2018, 41(5): 398-402.
- [4] Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer [J]. Gene, 2006, 366(1): 2-16.
- [5] 冯子强, 左国伟, 石庆强, 等. 人参皂苷Rh2抑制肝癌HepG2细胞迁移的实验研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(1): 61-65.
Feng Z Q, Zuo G W, Shi Q Q, et al. Mechanism of ginsenoside Rh2 inhibiting HepG2 cells migration [J]. Cell Mol Immun, 2015, 31(1): 61-65.
- [6] Long N, Peng S, Chu L, et al. Paclitaxel inhibits the migration of CD133+ U251 malignant glioma cells by reducing the expression of glycolytic enzymes [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(5): 72.
- [7] Liang N J, Kitts D. Role of chlorogenic acids in

- controlling oxidative and inflammatory stress conditions [J]. *Nutrients*, 2015, 8(1): 16.
- [8] Yan Y, Li J, Han J, et al. Chlorogenic acid enhances the effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of extracellular signal-regulated kinases [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2015, 26(5): 540-546.
- [9] Xue N N, Zhou Q, Ji M, et al. Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39011.
- [10] Chen Y. Scratch wound healing assay [J]. *Bio-protocol*, 2012, 2(5): e100.
- [11] Valster A, Tran N L, Nakada M, et al. Cell migration and invasion assays [J]. *Methods*, 2005, 37(2): 208-215.
- [12] Stefania N, Marco P. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay [J]. *NAT Protocols*, 2007, 2(11): 2918-2923.
- [13] 陈锡强, 韩利文, 王希敏, 等. 人乳腺癌斑马鱼移植瘤模型建立 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(1): 128-132.
Chen X Q, Han L W, Wang X M, et al. Model establishment of xenotransplantation of human breast cancer in zebrafish embryos [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(1): 128-132.
- [14] Wittemer S M, Ploch M, Windeck T, et al. bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans [J]. *Phytomed*, 2005, 12(1/2): 28-38.
- [15] Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(22): 16986-16992.
- [16] Claesson W L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(Pt 1): 20-24.
- [17] Gu W T, Yang Y, Zhang C. Caffeic acid attenuates the angiogenic function of hepatocellular carcinoma cells via reduction in JNK-1-mediated HIF-1 α stabilization in hypoxia [J]. *RSC Adv*, 2016(86): 82774-82782.
- [18] Bode A M, Dong Z. Molecular targets of coffee phytochemicals caffeic acid and chlorogenic acid in chemoprevention [A]// Preedy V, London K C. *Coffee in Health and Disease Prevention* [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2015: 673-680.
- [19] In J K, Kim J K, Oh J S, et al. 5-Caffeoylquinic acid inhibits invasion of non-small cell lung cancer cells through the inactivation of p70S6K and Akt activity: Involvement of p53 in differential regulation of signaling pathways [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48: 1907-1912.
- [20] 陈锡强, 彭维兵, 侯海荣, 等. 27种中药提取物抑制血管生成活性的评价 [J]. *山东科学*, 2013, 26(3): 21-25.
Chen X Q, Peng W B, Hou H R, et al. Evaluation of anti-angiogenic activity of the extracts from 27 traditional Chinese herbs [J]. *Shandong Sci*, 2013, 26(3): 21-25.

[责任编辑 兰新新]