

降钙素基因相关肽对人脐静脉内皮细胞增殖和迁移的作用及其机制

王元会 葛淑惠 孙晨鸣

(济宁医学院康复医学院, 济宁 272067)

摘要 **目的** 探讨降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖、迁移的作用及其机制。**方法** 培养 HUVECs, 随机分为对照组(Control组)、CGRP组、VEGF抑制剂组(Bevacizumab组)、一氧化氮合成酶抑制剂组(L-NMMA组)。MTT法检测 CGRP、贝伐珠单抗、L-NMMA对 HUVECs 增殖的影响;划痕实验测定 HUVECs 迁移情况;Western blot和细胞免疫荧光检测相关蛋白表达情况。**结果** CGRP与降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)结合能显著促进 HUVECs 增殖($t=3.434, P<0.05$),抑制血管内皮生长因子(VEGF)或内皮型一氧化氮合酶(eNOS)能显著抑制 CGRP 诱导的 HUVECs 增殖,主要表现在 HUVECs 存活率($P<0.05$)和内皮细胞标志物($P<0.05$)的表达显著降低。划痕实验结果显示抑制 VEGF 或 eNOS 可显著抑制 CGRP 诱导的 HUVECs 迁移($P<0.05$)。抑制 VEGF 或 eNOS 能显著降低与增殖密切相关的激酶 Raf-1 的表达($P<0.05$),同时显著抑制其下游 ERK($P<0.05$)和 JNK($P<0.05$)信号通路激活。**结论** CGRP 通过激活 VEGF/eNOS-Raf-1-ERK/JNK 信号通路诱导 HUVECs 增殖和迁移,抑制 VEGF 或 eNOS 可能是抗血管生成的潜在靶点。

关键词 降钙素基因相关肽;血管内皮生长因子;一氧化氮;内皮细胞增殖

中图分类号:R543.7 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2024)08-269-06

The effect of calcitonin gene-related peptide on proliferation and migration of human umbilical vein and its mechanisms

WANG Yuanhui, GE Shuhui, SUN Chenming

(College of Rehabilitation Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the underlying mechanisms. **Methods** HUVECs were cultured and randomly divided into control group, CGRP group, bevacizumab (VEGF inhibitor) group, and L-NMMA (nitric oxide synthase inhibitor) group. The MTT assay was employed to evaluate the effects of CGRP, bevacizumab and L-NMMA on the viability of HUVECs. The scratch assay was conducted to assess the migration of HUVECs and the expression levels of relevant proteins were detected by immunocytochemistry assay and Western blot. **Results** CGRP treatment markedly promoted the proliferation of HUVECs by binding to its receptor, calcitonin receptor-like receptor (CRLR) ($t=3.434, P<0.05$). When VEGF or eNOS was inhibited, the CGRP-induced endothelial cell proliferation was significantly suppressed, as indicated by decreased cell viabilities ($P<0.05$) and the expression of cell makers ($P<0.05$). In the CGRP stimulated HUVECs, inhibition of VEGF or eNOS could also suppress cell migration as detected by the scratch assay ($P<0.05$). Additionally, inhibition of VEGF or eNOS decreased the expression of the Raf-1, a kinase that is closely related to proliferation ($P<0.05$). It also reduced the activities of its downstream extracellular-signal-regulated kinase (ERK) ($P<0.05$) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) ($P<0.05$) signaling pathways in HUVECs stimulated by CGRP. **Conclusion** CGRP may induce HUVECs proliferation and migration

through activating the VEGF/eNOS-Raf-1-ERK/JNK signaling pathway, suggesting that inhibition of VEGF or eNOS may serve as a potential target for anti-angiogenic therapy.

Keywords: Calcitonin gene-related peptide; Vascular endothelial-derived growth factor; Nitric oxide; Endothelial cell proliferation

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是一种广泛分布于心血管系统的活性肽^[1-2], 作为强效血管舒张剂发挥作用^[3], 其血管舒张作用由 CGRP 受体介导, 依赖于 NO 和血管内皮细胞。缺血或运动时 CGRP 可以显著改善血液循环, 然而具体机制尚未完全阐明。由内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric-oxide synthase, eNOS) 产生的 NO 能够调节血管生成和动脉生成^[4], 而血管内皮生长因子 (vascular endothelial-derived growth factor, VEGF) 在血管生成机制中发挥重要作用^[5]。CGRP 可增加内皮细胞的管腔样形成, 促进血管生成^[6]。本研究旨在探讨 CGRP 对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 增殖、迁移的影响及 VEGF 和 eNOS 在其中的作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVECs (中国医学科学院基础医学研究所细胞培养中心); β -CGRP (MCE 公司, 中国); 贝伐珠单抗 (Bevacizumab), L-NMMA (Beyotime 公司, 中国); 微孔板读取器 (Thermofisher 公司, 美国); 蛋白酶磷酸酶抑制剂, 蛋白酶抑制剂, BCA 试剂盒 (Sangon 公司, 中国); 小鼠抗 GAPDH 抗体, 兔抗 JNK 抗体, 兔抗 p-JNK 抗体, 兔抗 ERK 抗体, 兔抗 p-ERK 抗体, 兔抗 eNOS 抗体, 兔抗 CRLR 抗体 (ABclonal 公司, 中国); 小鼠抗 Raf-1 抗体 (Proteintech 公司, 中国); 兔抗 CD31 抗体 (Abcam 公司, 美国); 山羊抗兔辣根过氧化物酶 (HRP) IgG (H+L), 山羊抗兔 TRITC 抗体, 山羊抗小鼠 FITC-IgG (H+L) (ABclonal 公司, 中国); 增强化学发光液 (Yeasen 公司, 中国); 共聚焦显微镜 (Leica 公司, 德国); LAS4000 凝胶成像仪 (GE Healthcare 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 20% 胎牛血清、100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 80% DMEM 培养 HUVECs, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 湿化培养箱中。实验随机分为对照组 (Control 组)、CGRP 组、VEGF 抑制剂组 (Bevacizumab 组)、一氧化氮合酶 (eNOS) 抑

制剂组 (L-NMMA 组)。Control 组不给予任何处理; CGRP 组、Bevacizumab 组和 L-NMMA 组分别给予 1nM CGRP、1 μ g/mL Bevacizumab 和 100 μ M L-NMMA 处理 24h。每组实验重复 3 次。本研究已获得济宁医学院伦理委员会批准。

1.2.2 MTT 检测 将 HUVECs (8×10^3 /mL) 接种在 96 孔板, CGRP (1nM) 和 Bevacizumab (1 μ g/mL)/L-NMMA (100 μ M) 处理细胞 24h。然后加入 0.5mg/mL MTT 溶液, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4h。随后, 向孔中加入 150 μ L 二甲基亚砷振荡以完全溶解甲酰胺。在 570nm 处使用微孔板在酶标仪中测定吸光度值 (OD)。细胞存活率 = (OD 样品)/OD (对照) $\times 100\%$ 。

1.2.3 Western blot 检测 使用 RIPA 缓冲液、蛋白酶磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂裂解 HUVECs, 蛋白浓度通过 BCA 试剂盒测定。用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离样品, 将蛋白转移到 0.45 μ m 聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭膜 1.5h, 然后与以下抗体孵育: 小鼠抗 GAPDH 抗体 (1:10000), 兔抗 JNK 抗体 (1:1000), 兔抗 p-JNK 抗体 (1:1000), 兔抗 ERK 抗体 (1:1000), 兔抗 p-ERK 抗体 (1:1000), 兔抗 eNOS 抗体 (1:1000), 兔抗 CRLR 抗体 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。然后将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (1:5000) 在 24 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5h。用发光液和 LAS4000 凝胶成像仪显示蛋白条带, 并使用 Gel pro 4.0 软件对结果进行分析。

1.2.4 细胞免疫荧光检测 将 HUVECs 在爬片上培养并在 4% 甲醛固定 20min, 然后加入 Triton X-100 (0.1%) 使 HUVECs 透化。用 3% 山羊血清 24 $^{\circ}$ C 恒温箱下封闭细胞 90min, 并与抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜: 小鼠抗 Raf-1 抗体 (1:500) 或兔抗 CD31 抗体 (1:1000)。将 HUVECs 与相应的荧光二抗 (1:2000) 孵育 2h, 使用激光共聚焦显微镜观察。

1.2.5 划痕实验 将 HUVECs 细胞配制为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液备用。将划痕小室放入 12 孔板中, 使其位于孔中心位置且黏附在孔中。首先向划痕小室的两个小室中各加入 70 μ L 细胞悬液并吹

打均匀,再向孔中划痕小室外区域加入 860 μ L 细胞悬液并吹打均匀,培养过夜。次日于显微镜下观察 HUVECs 生长情况,细胞生长至 90% 聚合无重叠时可继续后续实验。弃去原有培养基,将划痕小室从孔中垂直取出。使用灭菌 PBS 清洗掉悬浮细胞后向孔中加入 PBS 于显微镜下拍照记为 0 时基础图像,0 时图像记录完毕后分别加入刺激剂和药物继续培养,于划痕形成后 24h 拍照记录划痕生长情况,获得图像使用 Image J 软件进行分析。

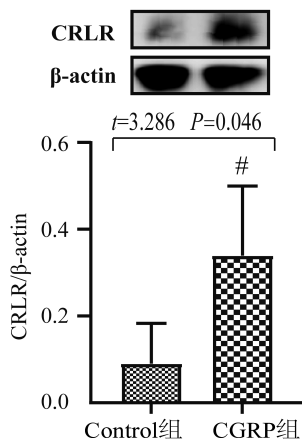
1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析。两组间比较采用 student-*t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 然后进行 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGRP 与受体 CRLR 结合促进 HUVECs 增殖

将 HUVECs 与浓度为 1nM 的 CGRP 孵育 24h, CGRP 可以显著提高细胞存活率 ($t = 3.434, P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,CGRP 刺激 HUVECs 后,CRLR 的表达显著增加 ($t = 3.286, P < 0.05$) (图 1)。



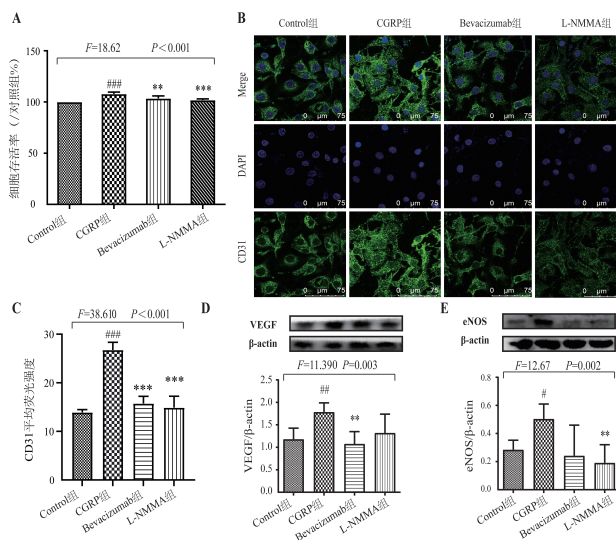
注:Western blot 检测 CRLR 的表达;# $P < 0.05$ vs Control 组。

图 1 CGRP 促进 HUVECs CRLR 的表达

2.2 Bevacizumab/L-NMMA 抑制 CGRP 诱导的 HUVECs 增殖

Bevacizumab (1 μ g/mL) 和 L-NMMA (100 μ M) 能显著抑制 CGRP 诱导的 HUVECs 增殖 (图 2A) ($P < 0.05$)。Western blot 和共聚焦结果显示,CGRP 刺激显著增加了 HUVECs 细胞的绿色荧光

强度,表明 CD31 的表达显著增加,即促进了 HUVECs 的增殖,Bevacizumab 或 L-NMMA 处理后显著降低 CD31 的表达 (图 2B 和 2C) ($P < 0.05$)。Western blot 结果进一步显示,Bevacizumab 或 L-NMMA 处理降低了 VEGF ($P < 0.05$) 和 eNOS ($P < 0.05$) 表达水平 (图 2D 和 2E)。



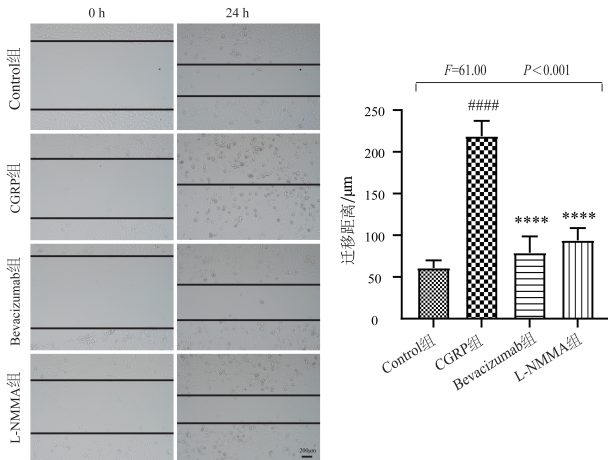
注:A 为 MTT 测定;B 为 CD31 (绿色)和 DAPI (蓝色)的免疫荧光染色;C 为 CD31 荧光强度统计分析;D 为 Western blot 检测 VEGF 表达;E 为 Western blot 检测 eNOS 表达;# $P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001$ vs Control 组; * $P < 0.01, *** P < 0.001$ vs CGRP 组。

2.3 Bevacizumab/L-NMMA 抑制 CGRP 诱导的 HUVECs 增殖

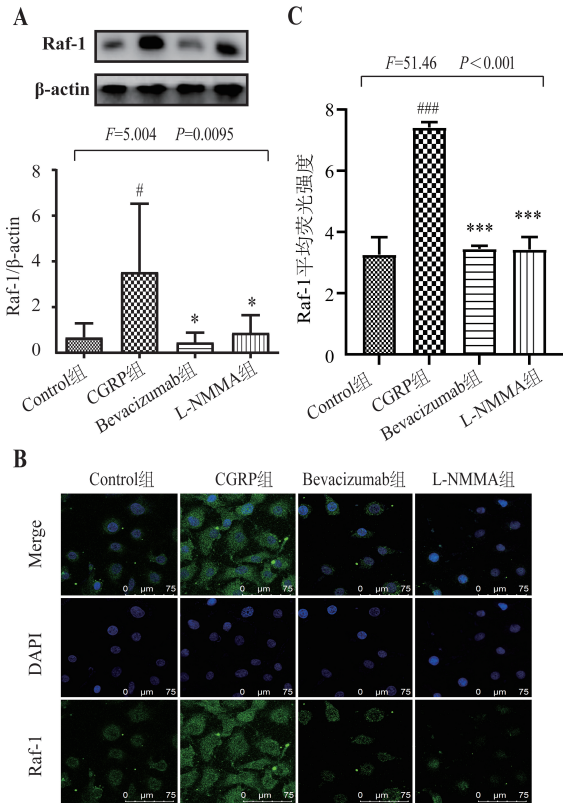
2.4 Bevacizumab/L-NMMA 降低 CGRP 诱导 HUVECs 的 Raf-1 表达

CGRP 刺激后 24h 显著增加 HUVECs 迁移距离,而 Bevacizumab 或 L-NMMA 能显著抑制 HUVECs 的迁移 ($P < 0.05$) (图 3)。

Raf-1 蛋白是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,是 Ras/Raf-1/MEK/ERK 信号级联的关键成分。蛋白质印迹结果显示,CGRP 可诱导 HUVECs 中 Raf-1 的表达增加,而 Bevacizumab 或 L-NMMA 显著降低 Raf-1 水平 ($P < 0.05$) (图 4A)。同样,共聚焦结果显示,Bevacizumab 或 L-NMMA 显著降低 Raf-1 染色荧光 (绿色)强度 ($P < 0.05$) (图 4B 和 4C)。



注:#### $P < 0.001$ vs Control 组;**** $P < 0.001$ vs CGRP 组。
图 3 Bevacizumab/L-NMMA 抑制 CGRP 诱导的 HUVECs 迁移

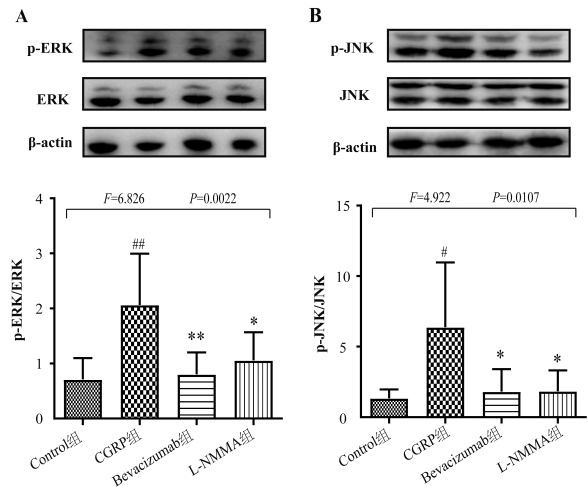


注:A为Western blot测定Raf-1的表达;B为Raf-1(绿色)和DAPI(蓝色)免疫荧光染色;C为Raf-1荧光强度统计分析;# $P < 0.05$,### $P < 0.001$ vs Control 组;* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ vs CGRP 组。
图 4 Bevacizumab/L-NMMA 抑制 HUVECs Raf-1 表达

2.5 Bevacizumab/L-NMMA 抑制 ERK 和 JNK 信号通路的激活

ERK 和 JNK 是 Raf-1 信号通路的下游,参与调

节细胞增殖。Western blot 结果显示 CGRP 刺激可提高磷酸化 ERK 和 JNK 水平,Bevacizumab 或 L-NMMA 显著抑制 ERK ($P < 0.05$) 和 JNK ($P < 0.05$) 的磷酸化(图 5A 和 5B)。



注:A为Western blot检测p-ERK/ERK表达;B为Western blot检测p-JNK/JNK表达;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ vs Control 组;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ vs CGRP 组。
图 5 Bevacizumab/L-NMMA 抑制 HUVECs ERK 和 JNK 信号通路

3 讨论

血管生长有血管生成和动脉生成两种形式,血管生成是指毛细血管网络的形成,动脉生成是指先前存在的侧支小动脉的生长^[7]。剪切力是动脉生成的主要刺激因素^[8]。有研究通过显微镜观察证实了 CGRP 对小动脉的血管舒张作用^[9],这种舒血管作用可以将先前存在的冠状动脉侧支张开,增加剪切力来刺激动脉生成。研究发现 CGRP 促进了小鼠缺血后肢的血运重建^[10],CGRP 基因敲除小鼠表现出与肿瘤相关的血管生成和肿瘤生长减少^[11],CGRP 可能通过动脉生成和血管生成两种效应来改善血液供应,但具体作用机制尚不清楚。

我们发现,CGRP 能显著促进 HUVECs 增殖和迁移(图 1,3)。Zhu 等^[12]也发现 CGRP 具有促进血管生成活性,导致血管内皮细胞增殖、迁移和管腔样形成,可促进小鼠角膜血管生成,但未深入进行机制研究。CRLR 是一种七跨膜 G 蛋白偶联受体蛋白,当受体活性修饰蛋白与 CRLR 结合时,它将介导 CGRP 的生物功能并启动各种信号通路^[13]。本文结果显示,CGRP 刺激 HUVECs 细胞

时, CRLR 的表达显著增加, 我们推测, CGRP 可能通过与受体 CRLR 结合显著增加 HUVECs 增殖和迁移。NOS 可能在 CGRP 诱导的离体血管舒张中发挥作用^[14]。CGRP 可促进 HUVECs VEGF 和 CD31 mRNA 的表达^[10]。eNOS^{-/-}小鼠表现出动脉生成缺陷, VEGF 诱导的内皮祖细胞动员显著减少^[4]。股动脉结扎的 eNOS^{-/-}小鼠中, 动脉直径和血液灌注量显著减少^[15]。VEGF 和 eNOS 可能参与了血管生成和动脉生成。Bevacizumab 是一种抗 VEGF 抗体, 可通过与内皮细胞表面的血管内皮生长因子受体 1 和血管内皮生长因子受体 2 结合来阻断所有 VEGF 受体抑制内皮细胞增殖和血管生成^[16]。L-NMMA 是 L-精氨酸的强效抑制剂, 以竞争性和渗透性的方式抑制 eNOS 产生 NO^[17]。Bevacizumab 和 L-NMMA 分别用于抑制 VEGF 和 eNOS。CD31 是内皮细胞的标志物, 其表达情况代表 HUVECs 增殖情况。在本研究中, 我们发现 VEGF 和 eNOS 可能参与 CGRP 诱导的 HUVECs 增殖。VEGF 抑制剂 Bevacizumab 和 eNOS 抑制剂 L-NMMA 显著抑制 CGRP 诱导的 HUVECs 的增殖和迁移能力。提示 CGRP 可能通过促进 VEGF 和 eNOS 的合成刺激内皮细胞增殖和迁移, VEGF 和 eNOS 都参与了 CGRP 的作用。

NO 调节 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路^[18], 而抑制 VEGFR2/Raf/MEK/ERK 通路可以抑制 VEGF 介导的胆管癌细胞系的迁移和侵袭^[19]。Raf-1 蛋白与肿瘤发生、增殖和凋亡、侵袭、转移和血管生成有关, 可被许多对调节增殖和凋亡至关重要的细胞因子激活。本文荧光结果显示, CGRP 显著诱导 Raf-1 的表达增加, 而 Bevacizumab 和 L-NMMA 显著降低 Raf-1 水平, 表明 CGRP 可能通过激活 VEGF/eNOS-Raf-1 途径诱导内皮细胞增殖。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路是调节细胞增殖、分化和凋亡等关键信号通路^[20]。在 MAPK 家族成员中, ERK 和 JNK 信号通路被认为是导致 HUVECs 增殖和迁移的主要因素^[21-22]。CGRP 通过 CGRP 受体和 ERK1/2 MAPK 信号通路调节人 HaCaT 角质形成细胞中 VEGF 的表达^[23], 但对血管内皮细胞的作用机制尚未明确。动物实验发现, CGRP 可能通过 CGRP1 受体/ERK 通路发挥作用^[24]。我们的数据表明 CGRP 刺激显著提高 ERK 和 JNK 磷酸化水平, 这表明 CGRP 能够激活 ERK 和 JNK 信号通路, 而抑制 VEGF 和

eNOS 通过抑制 Raf-1-ERK/JNK 信号通路降低 CGRP 诱导的内皮细胞增殖和迁移。基于这些发现, 说明 CGRP 通过激活 ERK 和 JNK 信号通路促进 HUVECs 增殖和迁移。

本研究结果表明, CGRP 可能通过促进 VEGF 和 eNOS 的合成, 进而激活 Raf-1-ERK/JNK 信号通路, 从而促进 HUVECs 增殖和迁移。CGRP 诱导的内皮细胞增殖和迁移是通过激活 VEGF/eNOS-Raf-1-ERK/JNK 信号通路实现。本研究结果不仅表明 CGRP 对血管再生有有益作用, 而且为临床缺血组织的血管生物搭桥提供了新的治疗思路 and 路径, 成为血管再通治疗的辅助方法; 同时也为抑制 VEGF 或 eNOS 作为抗肿瘤组织血管生成潜在靶点提供了实验依据。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Favoni V, Giani L, Al-Hassany L, et al. CGRP and migraine from a cardiovascular point of view: what do we expect from blocking CGRP? [J]. J Headache Pain, 2019, 20(1): 27. DOI: 10.1186/s10194-019-0979-y.
- [2] de Vries T, Labrujere S, Rivera-Mancilla E, et al. Intracellular pathways of calcitonin gene-related peptide-induced relaxation of human coronary arteries: a key role for Gβγ subunit instead of cAMP [J]. Br J Pharmacol, 2024, 181(15): 2478-2491. DOI: 10.1111/bph.16372.
- [3] Bonura A, Brunelli N, Marcosano M, et al. Calcitonin gene-related peptide systemic effects: embracing the complexity of its biological roles—a narrative [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(18): 13979. DOI: 10.3390/ijms241813979.
- [4] Rajendran S, Shen XG, Glawe J, et al. Nitric oxide and hydrogen sulfide regulation of ischemic vascular growth and remodeling [J]. Compr Physiol, 2019, 9(3): 1213-1247. DOI: 10.1002/cphy. c180026.
- [5] Ahmad A, Nawaz MI. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis [J]. J Cell Biochem, 2022, 23(12): 1938-1965. DOI: 10.1002/jcb.30344.
- [6] Toda M, Suzuki T, Hosono K, et al. Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(36): 13550-13555. DOI: 10.1073/pnas.0800767105.
- [7] Leung FP, Yung LM, Laher I, et al. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1) [J]. Sports Med, 2008, 38(12): 1009-1024. DOI: 10.2165/00007256-200838120-00005.
- [8] Nabil AR, Bo Z, Pamela CL. Fluid shear stress regulates placental growth factor expression via heme oxygenase 1 and iron [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 14912. DOI: 10.1038/s41598-021-94559-w.

- [9] Homma S, Kimura T, Sakai S, et al. Calcitonin gene-related peptide protects the myocardium from ischemia induced by endothelin-1; Intravital microscopic observation and ³¹P-MR spectroscopic studies [J]. *Life Sci*, 2014, 118 (2) : 248-254. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.02.024.
- [10] Mishima T, Ito Y, Hosono T, et al. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300 (2) : H431-H439. DOI: 10.1152/ajpheart.00466.
- [11] Toriyama Y, Iesato Y, Imai A, et al. Pathophysiological function of endogenous calcitonin gene-related peptide in ocular vascular diseases [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185 (6) : 1783-1794. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.02.017.
- [12] Zhu SY, Zidan A, Pang KP, et al. Promotion of corneal angiogenesis by sensory neuron-derived calcitonin gene-related peptide [J]. *Exp Eye Res*, 2022, 220 (7) : 109125. DOI: 10.1016/j.exer.2022.109125.
- [13] Suekane A, Saito Y, Nakahata S, et al. CGRP-CRLR/RAMP1 signal is important for stress-induced hematopoiesis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1) : 429. DOI: 10.1038/s41598-018-36796-0.
- [14] Ay I, Tuncer M. Mechanism of CGRP-induced vasodilation in the rat isolated perfused kidney [J]. *Pharmacology*, 2004, 71 (4) : 209-215. DOI: 10.1159/000078087.
- [15] Park B, Hoffman A, Yang YG, et al. Endothelial nitric oxide synthase affects both early and late collateral arterial adaptation and blood flow recovery after induction of hind limb ischemia in mice [J]. *J Vasc Surg*, 2010, 51 (1) : 165-173. DOI: 10.1016/j.jvs.2009.08.045.
- [16] Mynampati BK, Sambhav K, Grover S, et al. Inhibition of proliferation of retinal vascular endothelial cells more effectively than choroidal vascular endothelial cell proliferation by bevacizumab [J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(1) : 15-22. DOI: 10.18240/ijo.2017.01.03.
- [17] Mammedova JT, Sokolov AV, Freidlin IS, et al. The mechanisms of L-Arginine metabolism disorder in endothelial cells [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2021, 86 (2) : 146-155. DOI: 10.1134/S0006297921020036.
- [18] Zhang LL, Chen L, Qi M, et al. Glyphosate induces autophagy in hepatic L8824 cell line through NO-mediated activation of RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway and energy metabolism disorders [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2023, 137 (6) : 108772. DOI: 10.1016/j.fsi.2023.108772.
- [19] Huang MP, Huang B, Li GW, et al. Apatinib affect VEGF-mediated cell proliferation, migration, invasion via blocking VEGFR2/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways in cholangiocarcinoma cell [J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18 (1) : 169. DOI: 10.1186/s12876-018-0870-3.
- [20] He H, Zou Z, Wang B, et al. Copper oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and cell death via copper ion-mediated P38 MAPK activation in vascular endothelial cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15 (5) : 3291-3302. DOI: 10.2147/IJN.S241157.
- [21] Wang W, Kang Y, Jiang Y, et al. Mifepristone increases AQP1 mRNA expression, angiogenesis, and cell permeability through the ERK MAPK pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 50 (2) : 1069-1077. DOI: 10.1007/s11033-022-08082-w.
- [22] Wang XW, Zhang W. Long non-coding RNA cancer susceptibility candidate 2 inhibits the cell proliferation, invasion and angiogenesis of cervical cancer through the MAPK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(8) : 3261-3269. DOI: 10.26355/eurrev_201904_17687.
- [23] Yu XJ, Li CY, Wang KY, et al. Calcitonin gene-related peptide regulates the expression of vascular endothelial growth factor in human HaCaT keratinocytes by activation of ERK1/2 MAPK [J]. *Regul Pept*, 2006, 137 (3) : 134-139. DOI: 10.1016/j.reg-pep.2006.07.001.
- [24] Tian RM, Zhang Y, Pan Q, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096BS regulates synaptic transmission in the vestibular nucleus and improves vestibular function via PKC/ERK/CREB pathway in an experimental chronic migraine rat model [J]. *J Headache Pain*, 2022, 23 (1) : 35. DOI: 10.1186/s10194-022-01403-1.

(收稿日期 2024-04-14)

(本文编辑:石俊强)