

低能量 ALA-PDT 对脑组织新生血管形成及 胶质瘤生长的影响

孙 影¹ 张雪鹏² 刘 巍³

¹河北联合大学基础医学院病理学教研室, 河北 唐山 063000
²河北联合大学附属医院肿瘤外科, 河北 唐山 063000
³河北医科大学第四医院肿瘤内科, 河北 石家庄 050011

摘要 观察了低能量 5-氨基乙酰丙酸介导的光动力学疗法(ALA-PDT)对脑组织新生血管形成和胶质瘤生长的影响。用 10 J/cm² 的 ALA-PDT 照射 27 只裸小鼠大脑皮层后第 1、5、10 天,利用二维、三维图像观察新生血管形成,western blot 检测缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和血管内皮生长因子(VEGF)表达。另将 12 只裸小鼠分为对照组(无特殊处理)和 ALA-PDT 预处置组(10 J/cm²),ALA-PDT 预处置后第 10 天,颅内接种 U87 胶质瘤细胞,21 天检测肿瘤体积。结果发现,以照射区对侧大脑相应区域为对照,低能量 ALA-PDT 照射后第 1 和 5 天,血管形态无明显变化,第 10 天有新生血管形成;VEGF 在照射后第 5 和 10 天显著增高;HIF-1 α 在照射后第 1 天即开始增高,随后越发明显。低能量 ALA-PDT 可通过 HIF-1 α 诱导 VEGF 高表达和新生血管形成,这种微环境的改变有助于 U87 脑胶质瘤细胞的生长。

关键词 医用光学;光动力学疗法;新生血管;脑胶质瘤

中图分类号 TN249;R739.41 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201239.0804001

Effect of Low Energy ALA-PDT on Angiogenesis and Glioma Growth in Brain

Sun Ying¹ Zhang Xuepeng² Liu Wei³

¹Department of Pathology, Elementary Medical College, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China
²Department of Surgical Oncology, Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China
³Department of Oncology, 4th Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China

Abstract Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy (ALA-PDT) with low energy on intracranial angiogenesis and glioma growth are evaluated. Twenty seven nude mice are received low energy of ALA-PDT (ALA: 300 mg/kg, dose: 10 J/cm²) on the right side of the cerebral cortex. After 1, 5, 10 days, angiogenesis is evaluated by 2 and 3 dimensional vessel images, and expressions of VEGF and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) by western blot. Other 12 nude mice are divided into control and ALA-PDT (10 J/cm²) pretreated groups. Ten days after pretreatment, mice are implanted intracerebral U87 glioma; and tumor volume is calculated by H. E staining after 21 days. Results show that the vessels in the contralateral brain are as control. Both 2 and 3 dimensional vessel images shown that there is no difference in the microvessels morphology on the first and fifth days after ALA-PDT compared with control. However, there is angiogenesis on the tenth days showing as decreased length, increased diameter and the number of branch points. VEGF expression significantly increased on fifth day and becomes higher on the tenth days after ALA-PDT, although there is no change on the first day; while HIF-1 α expressions increased on the first day and become higher and higher. ALA-PDT with low energy can induce VEGF expression and intracerebral angiogenesis mediated by HIF-1 α , and this effect promotes glioma growth in brain.

Key words medical optics; photodynamic therapy; angiogenesis; glioma

OCIS codes 170.5180; 170.2520; 170.1790; 170.6900

收稿日期: 2012-03-28; 收到修改稿日期: 2012-05-06

基金项目: 2011 年河北省留学人员择优资助科技活动项目(冀人社字[2011]226 号)和河北省教育厅科研计划项目(Z2008454)资助课题。

作者简介: 孙 影(1976—),女,博士,副教授,主要从事肿瘤病理方面的研究。E-mail: ysun7177@hotmail.com

1 引言

5-氨基乙酰丙酸介导的光动力学疗法(ALA-PDT)是一种新兴的局部治疗肿瘤的方法,以诱导肿瘤细胞死亡为主要手段,在治疗卵巢癌和胶质瘤等方面取得了良好的效果^[1,2]。最近的研究表明,PDT照射可引起局部组织血管内皮生长因子(VEGF)表达增高^[3,4],但机制并不清楚。PDT在治疗过程中会消耗大量氧气,同时因破坏血管使供氧减少,所以PDT照射后局部组织处于缺氧状态。研究表明在PDT照射或二氧化钴诱导组织缺氧后,缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)被激活,表达增高,HIF-1 α 是一种核转录调控因子,激活后由胞浆转至胞核,调节靶基因的转录,VEGF是其重要的下游靶基因之一^[5,6]。因此可以推测ALA-PDT可能通过激活HIF-1 α 来诱导VEGF的表达,并由此促进新生血管形成,但迄今为止未见相关报道。

ALA-PDT,尤其是低能量可否可通过诱导HIF-1 α /VEGF途径来诱导新生血管形成与其治疗胶质瘤的效果密切相关。胶质瘤细胞的侵袭能力很强,体积较大的肿瘤常伴有深部浸润^[7],但因为PDT的能量随组织深度的增加而衰减,而低能量PDT的杀伤能力很差,所以ALA-PDT不能杀伤这些深部浸润的细胞^[8]。若低能量ALA-PDT尚可诱导新生血管形成,那么新生的血管将会为残存的肿瘤提供氧气和营养物质,加速胶质瘤的生长和复发。

本文将检测低能量ALA-PDT照射后局部组织新生血管形成、HIF-1 α 和VEGF的表达情况,同时观察这种局部微环境的改变对U87脑胶质瘤细胞生长的影响,为正确评价ALA-PDT治疗胶质瘤提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 实验动物及主要试剂

Nu/Nu裸小鼠(20~25 g,北京维通利华实验动物中心)。U87胶质瘤细胞(美国密歇根州亨利·福特医院姜丰研究员惠赠)。ALA(美国Sigma Chemical公司);VEGF、HIF-1 α 、 β -actin抗体(武汉博士德生物技术公司)。半导体激光仪(加拿大University Health Network);激光扫描共焦显微镜(美国Bio-Rad公司);振荡切片仪(美国Stoelting公司);MCID图像分析系统(英国MCID公司)。

2.2 实验分组

27只裸小鼠接受10 J/cm²的ALA-PDT照射

右侧大脑皮层,照射后第1、5、10天分别检测照射区域新生血管形成、HIF-1 α 和VEGF表达,以对侧相应区域的脑组织为对照组。

另12只裸小鼠分为对照组和ALA-PDT预处置组。对照组无特殊处理,ALA-PDT预处置组在接受10 J/cm²ALA-PDT照射后,第10天在照射区种植U87细胞,第21天观察肿瘤生长情况。

2.3 ALA-PDT照射

半导体激光仪发射(635 \pm 5)nm波长的红色激光,经光导纤维输出,并在输出端接直径7 mm的微凸镜。PDT照射前3 h小鼠腹腔注射300 mg/kg ALA。PDT的照射中点为前囟中点前1 mm,矢状缝向右旁开2 mm。照射时激光发射仪的输出端功率为100 mW,光斑直径7 mm,照射时间为38 s,用时间(s)与光斑面积(cm²)之积除以输出功率(W)得到对应的能量密度10 J/cm²。照射后常规饲养。

2.4 脑内种植U87胶质瘤细胞

U87胶质瘤细胞在体积分数为10%胎牛血清的细胞培养基(DMEM)中培养,消化后调整细胞悬液浓度为10⁸ mL⁻¹,台盼蓝染色检测活细胞比率大于95%。裸小鼠麻醉后固定于脑立体定向仪上,在照射区域注射细胞悬液5 μ L(5 \times 10⁵个细胞)。

2.5 冰冻切片的制备及脑血管二维图像的采集

小鼠拟处死前2 min,尾静脉注射异硫氰酸荧光素(FITC,质量浓度为50 g/L)0.1 mL。脑组织经OTC包埋后冰冻切片,在免疫荧光显微镜下FITC在血管内发出波长为495 nm的绿色荧光。

2.6 振荡切片的制备及脑血管三维图像的采集和分析

小鼠尾静脉注射FITC。脑组织经OTC包埋后用振荡切片仪连续切片,切片厚度为100 μ m,每间隔1 mm选取1张切片,共选取5张。激光扫描共焦显微镜扫描切片后,通过重构程序建立三维立体图像,并用定量分析程序测量血管的分支点数目、每段血管的长度和直径。

2.7 Western blot检测VEGF和HIF-1 α 的表达

脑组织在组织裂解液中经匀浆后低温高速离心30 min,收集上清。考马斯亮蓝染色检测总蛋白浓度,取60 μ g总蛋白按常规方法进行8% SDS-PAGE电泳并转膜,5%脱脂奶粉室温下封闭1 h,加入封闭液稀释的抗VEGF、HIF-1 α 和 β -actin的I抗,4 $^{\circ}$ C过夜。次日漂洗后加入稀释的相应的II抗,室温反应1 h。二氨基联苯胺(DAB)显色,Quantity one软件分析灰度值。

2.8 肿瘤体积

脑组织经石蜡包埋、H. E. 染色后,光镜(8×)下完整勾画肿瘤的病灶范围并记录病灶的面积,面积总和与厚度之积即是肿瘤体积。

2.9 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理,测量所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析检验(ANOVA),并用 Student-Newman-Keuls 法进行两组间均数比较, $P < 0.05$ 表示统计学上有显著性差异。

3 结 果

3.1 脑血管二维图像的分析

脑血管发出绿色荧光;当有新生的血管形成时,表现为管径增粗、分支增多,而每段血管的长度下降。与对侧相应区域(对照组)比较,照射后第 1、5 天,脑血管仅略增粗,但在照射后第 10 天,血管结构明显紊乱,直径增粗的血管增多,提示有异常的新生血管形成,如图 1 所示。

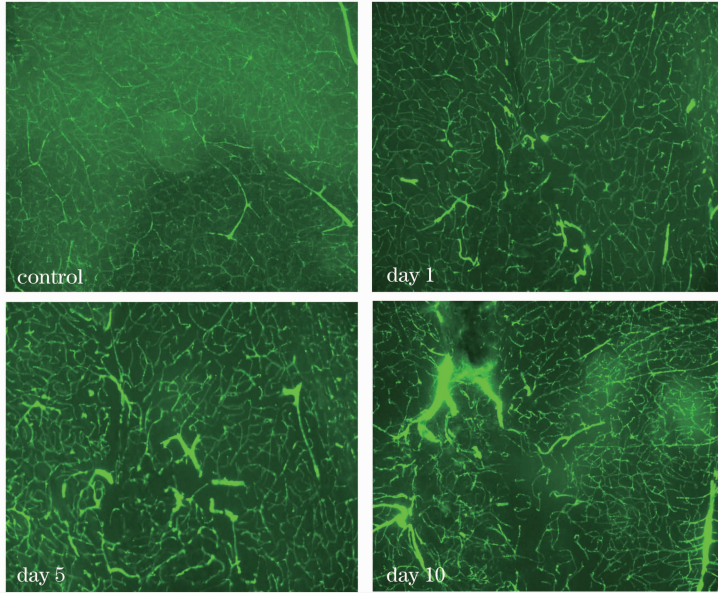


图 1 低能量 ALA-PDT 对裸鼠脑组织新生血管形成的影响(二维图像,×4)

Fig. 1 Effect of low energy ALA-PDT on intracerebral angiogenesis in nude mice (2D image, ×4)

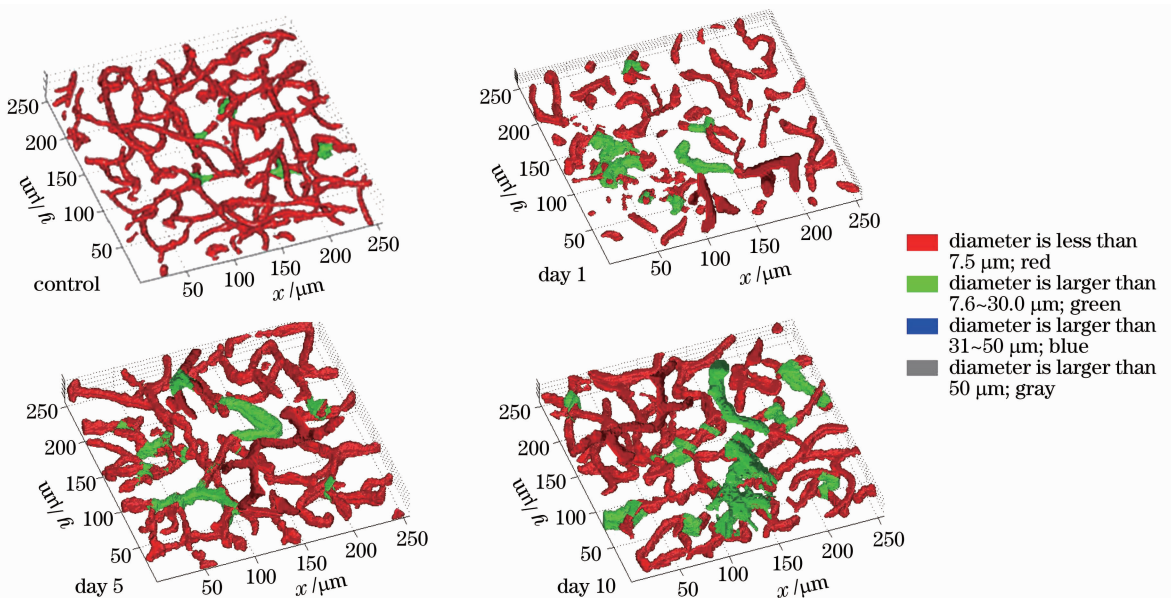


图 2 低能量 ALA-PDT 对裸鼠脑组织新生血管形成的影响(三维图像)

Fig. 2 Effect of low energy ALA-PDT on intracerebral angiogenesis in nude mice (3D image)

3.2 脑血管三维重建图像的分析

由图 2 和表 1 可见,与对照组比较,照射后第 1 和 5 天脑血管略增粗,每段血管的长度略下降,但差异不明显;在照射后第 10 天,照射区的血管直径和

分支点数目显著增加,而长度显著下降,表明有新生血管形成。这些结果与脑血管二维图像的结果一致,说明低能量 ALA-PDT 确可诱导正常脑组织产生新生血管。

表 1 低能量 ALA-PDT 对正常裸鼠脑组织新生血管形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of low energy ALA-PDT on intracerebral angiogenesis in nude mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

	Control	Day 1	Day 5	Day 10
Segment length / μm	35.44 \pm 3.16	30.37 \pm 2.95	29.89 \pm 2.86	28.37 \pm 2.55*
No. of branch points	24.23 \pm 3.85	21.42 \pm 4.26	28.57 \pm 4.26	33.47 \pm 3.51*
Branch diameter / μm	4.38 \pm 2.02	6.02 \pm 1.16	7.58 \pm 2.14	9.82 \pm 2.78*

* $P < 0.05$ compared with control

3.3 低能量 ALA-PDT 照射后脑组织 VEGF 的表达

正常脑组织 VEGF 的表达极低,与对照组比较,ALA-PDT 照射后第 1 天照射区 VEGF 的表达无明显变化,但在照射后第 5 天,VEGF 的表达开始增高,第 10 天增高进一步明显,说明低能量 ALA-PDT 照射可促进脑组织 VEGF 的表达,具有一定的实效关系,如图 3 所示。

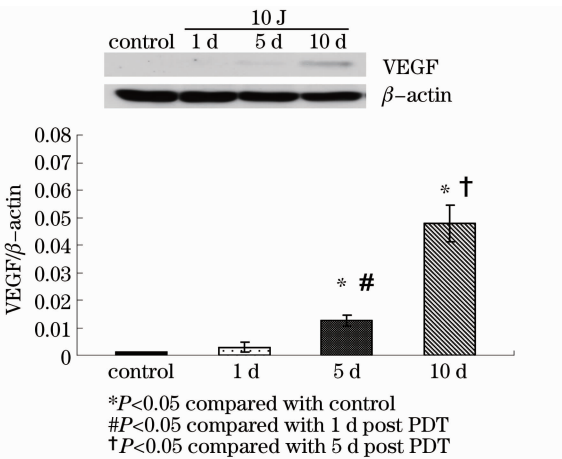


图 3 低能量 ALA-PDT 对裸鼠脑组织 VEGF 表达的影响

Fig. 3 Effect of low energy ALA-PDT on VEGF expressions in nude mice

3.4 低能量 ALA-PDT 照射后脑组织 HIF-1 α 的表达

正常脑组织 HIF-1 α 的表达很低,与对照组比较,ALA-PDT 照射后第 1 天照射区内 HIF-1 α 的表达即明显增高,而且随照射后时间的延长增高越发明,说明低能量 ALA-PDT 照射可促进脑组织 HIF-1 α 的表达,如图 4 所示。

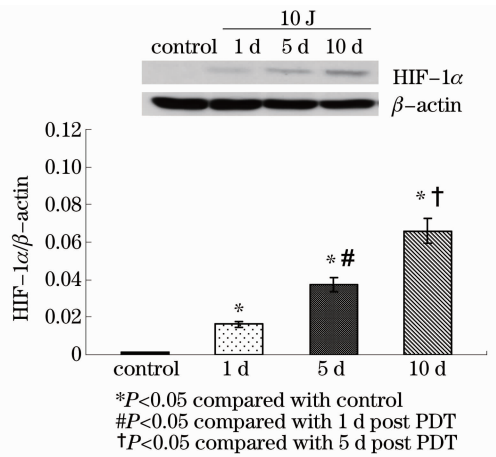


图 4 低能量 ALA-PDT 对裸鼠脑组织 HIF-1 α 表达的影响

Fig. 4 Effect of low dose ALA-PDT on HIF-1 α expressions in nude mice

后第 21 天有脑胶质瘤的生长,体积为 (8.29 \pm 2.12) mm^3 。PDT 预处置组的肿瘤体积为 (16.87 \pm 3.93) mm^3 ,明显大于对照组,说明低能量 ALA-PDT 照射所诱导的新血管形成有助于胶质瘤细胞的生长。

4 讨 论

ALA 是一种新的光敏剂前体物质,在体内经尿卟啉原合成酶(PBGD)等酶的作用合成光敏剂原卟啉 IX,因 PBGD 在多种恶性肿瘤细胞中的活性和表达远高于正常细胞,所以原卟啉 IX 在肿瘤组织中的含量也远高于正常组织,具有特异性。另外,ALA 成分单一、皮肤光毒性小、体内半衰期短,患者只需避光 24~48 h。因此 ALA-PDT 是一种具有良好发展前景的肿瘤治疗或辅助治疗手段^[9]。Wakui 等^[2]报道 ALA-PDT 可抑制大鼠卵巢癌的进展,这种作用与其诱导卵巢浆液性腺癌细胞凋亡有关。Bhowmick 等^[10]进一步研究发现,在 ALA-

3.5 低能量 ALA-PDT 预处置对裸鼠脑内胶质瘤生长的影响

由图 5 可见,裸鼠脑内立体定向种植 U87 细胞

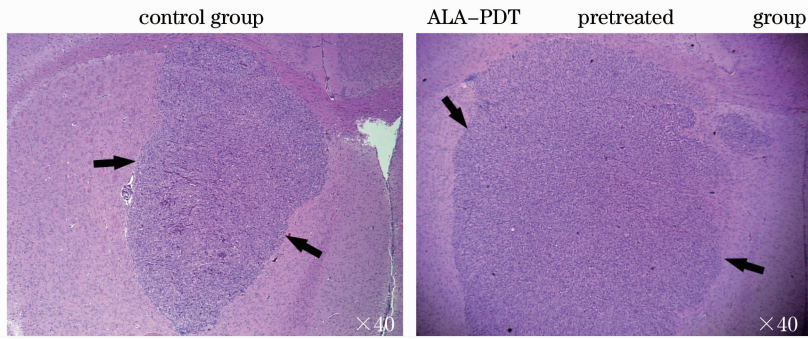


图 5 低能量 ALA-PDT 预处置后对裸鼠 U87 脑胶质瘤生长的影响

Fig. 5 Effect of intracerebral microenvironment changes induced by low energy ALA-PDT on glioma growth in nude mice

PDT 抑制乳腺癌细胞凋亡的过程中,ALA-PDT 激活了细胞内促凋亡的 JNK 和 P38 α 通路,同时抑制了促进细胞存活的 P38B 和 ERK1/2 通路,说明 ALA-PDT 除直接杀伤肿瘤细胞外,还可通过调节细胞内凋亡途径来促进细胞凋亡。另外最近的研究发现 ALA-PDT 还可激活巨噬细胞,使巨噬细胞释放反应性氧物质和肿瘤坏死因子 α (TNF α),从而杀伤肿瘤细胞^[11]。本课题组的前期实验表明 ALA-PDT 治疗脑胶质瘤有效,可明显地延长荷瘤鼠的生存时间,尤其是与手术切除联合使用,治疗效果更佳^[1]。

但是最近的研究发现 ALA-PDT 在治疗的过程中会引起一些不良反应,尤其是低能量的 ALA-PDT^[12,13]。本实验发现低能量的 ALA-PDT 照射后,照射区域内有新生血管形成,而且随着照射后时间的延长,新生血管也逐渐增多;更重要的是这些新生的血管有助于胶质瘤的生长。ALA-PDT 正常治疗剂量是 80 J/cm²,可实现对不超过 2 cm 厚的肿瘤进行杀伤^[8],所以在此范围内即使有新生血管形成也不会引起胶质瘤的复发;但是激光的能量会随着穿透深度的增加而衰减,因此对那些浸润深度超过这个范围的肿瘤细胞而言,ALA-PDT 的能量不足,不能杀伤这些细胞,相反低能量的 ALA-PDT 通过诱导新生血管促进这些细胞生长,因此会最终导致胶质瘤复发,严重影响治疗效果。

探寻低能量 ALA-PDT 诱导新生血管形成的发生机制可为今后减少或避免这种不良反应提供治疗依据。研究表明不同光敏剂介导的 PDT 可引起照射区域内炎症反应和多种细胞因子表达增高,其中包括促血管形成的多种细胞因子,如 VEGF、TNF- α 、bFGF 等^[14]。VEGF 被认为具有强烈的促进血管形成的作用,因此检测了 VEGF 的表达,结果发现 ALA-PDT 照射后第 1 天,VEGF 蛋白表达略有

增高,在照射后第 5 天增高更为明显,并可持续到第 10 天,说明 ALA-PDT 可诱导 VEGF 的表达。与此结果相似,Deininger 等^[15]用竹红菌甲素 A 和 B 介导的 PDT 照射细胞后,发现 VEGF 在提取细胞的培养上清中高表达,说明红菌甲素 A/B-PDT 也可诱导 VEGF 的表达。Bhuvaneswari 等^[16]利用 hypericin-PDT 治疗膀胱癌时发现,PDT 照射后 1 天,肿瘤照射区域内 VEGF 的表达即明显增高。Nowak-Sliwinska 等^[17]利用 Visudyne 介导的 PDT 照射鸡绒毛尿囊膜 6 h,VEGF 和 bFGF mRNA 表达即上升,并可随后刺激 VEGF 受体 1 和 2 mRNA 表达增高,由此推测 PDT 可迅速地刺激促血管形成的细胞因子表达增高,并通过诱导这些细胞因子的受体表达增高来维持局部血管形成的环境。

虽然大量的研究说明 PDT 诱导的新生血管形成与促血管形成的细胞因子表达增高有关,但深入的作用机制目前并不清楚。Gomer 等^[18]曾报道 PDT 诱导的细胞因子表达与组织缺氧有关。PDT 在治疗过程中需消耗大量的氧气,同时 PDT 破坏血管引起氧气供应减少,因此会造成局部组织缺氧。研究表明缺氧可诱导 HIF-1 α 的表达增强,本实验也证实低能量 ALA-PDT 照射后 HIF-1 α 的表达增高。HIF-1 α 是近年来发现的一种转录调控因子,在缺氧条件下表达增高及被激活,激活后的 HIF-1 α 在细胞核内与 HIF-1 β 结合形成稳定的二聚体 HIF-1,并通过与靶基因结合调控靶基因转录^[19]。HIF-1 α 可上调多种缺氧反应基因的转录,以改善组织的缺氧环境及使组织和细胞适应缺氧环境,VEGF 是其中最重要的靶基因之一^[20]。本研究中 HIF-1 α 和 VEGF 均随着 PDT 照射后时间的延长而表达逐渐增高,整体上具有一致性,只是在照射后第 1 天,照射区内 HIF-1 α 的表达已增高,但 VEGF 并未有明显变化,分析这可能与 HIF-1 α 是 VEGF 的上游调

控因子有关,虽然缺氧已诱导 HIF-1 α 的表达,但细胞仍需一定的时间合成 VEGF。

5 结 论

低能量 ALA-PDT 可通过 HIF-1 α 诱导照射区域 VEGF 高表达和新生血管形成,这种局部微环境的改变有助于胶质瘤的生长。因此在 ALA-PDT 治疗时,应与以抑制 VEGF 为主的抗血管形成药物联合使用,以减轻 ALA-PDT 的这种不良反应。

参 考 文 献

- Zhang Xuepeng, Yang Fang, Zhang Xianghong *et al.*. Experimental study of surgical resection combined with ALA-PDT treatment in rats with 9 L glioma[J]. *Chinese Journal of Laser Medicine & Surgery*, 2009, **18**(4): 213~217
张雪鹏, 杨 方, 张祥宏等. 手术切除联合 ALA-PDT 治疗 Fischer 大鼠 9 L 胶质瘤的实验研究[J]. *中国激光医学杂志*, 2009, **18**(4): 213~217
- M. Wakui, Y. Yokoyama, H. Wang *et al.*. Efficacy of a methyl ester of 5-Amino-levulinic acid in photodynamic therapy for ovarian cancers [J]. *J. Cancer Res. Clin.*, 2010, **136**(8): 1143~1150
- R. Bhuvanewari, G. Y. Yuen, S. K. Chee *et al.*. Hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with Avastin (bevacizumab) improves tumor response by downregulating angiogenic proteins [J]. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **12**(6): 1275~1283
- F. Jiang, X. Zhang, S. N. Kalkanis *et al.*. Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma[J]. *Photochem Photobiol*, 2008, **84**(1): 128~137
- Z. Ji, G. Yang, S. Shahzidi *et al.*. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy [J]. *Cancer Lett.*, 2006, **244**(2): 182~189
- M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, J. Skarlatos *et al.*. Hypoxia inducible factor (HIF-1 α and HIF-2 α) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy[J]. *Cancer Res.*, 2001, **61**(5): 1830~1832
- F. Winkler, Y. Kienast, M. Fuhrmann *et al.*. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis[J]. *Glia*, 2009, **57**(12): 1306~1315
- Peng Ping, Yang Zhilin. The observation of the effect of photodynamic therapy for glioma [J]. *Journal of Basic and Clinical Oncology*, 2006, **19**(5): 392~393

- 彭 苹, 杨志林. 脑胶质瘤光动力学治疗方法及疗效观察[J]. *肿瘤基础与临床*, 2006, **19**(5): 392~393
- B. Zhao, Y. Y. He. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy[J]. *Expert Rev. Anticancer.*, 2010, **10**(11): 1797~1809
- R. Bhowmick, A. W. Girotti. Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, **47**(6): 731~740
- A. Kawczyk-Krupka, Z. Czuba, E. Szliszka *et al.*. The role of photosensitized macrophages in photodynamic therapy[J]. *Oncol Rep.*, 2011, **26**(1): 275~280
- Zhu Ling, Wu Defeng, Wang Yongqing *et al.*. Modulation of low intensity laser irradiation on expression suppression of circadian clock genes in cultured fibroblasts[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(8): 0804001
朱 玲, 吴德峰, 王永庆等. 低强度半导体激光照射调节成纤维细胞时钟基因表达[J]. *中国激光*, 2011, **38**(8): 0804001
- Li Qishi, Zhou Yanmin, Chen Yingxin *et al.*. Effect of low level laser therapy on bone defect of an animal model[J]. *Chinese J. Lasers*, 2011, **38**(11): 1104004
李秋实, 周延民, 陈英新等. 低能量激光治疗对骨缺损动物模型的影响[J]. *中国激光*, 2011, **38**(11): 1104004
- R. Bhuvanewari, Y. Y. Gan, K. K. Yee *et al.*. Effect of hypericin-mediated photodynamic therapy on the expression of vascular endothelial growth factor in human nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int. J. Mol. Med.*, 2007, **20**(4): 421~428
- M. H. Deininger, T. Weinschenk, M. H. Morgalla *et al.*. Release of regulators of angiogenesis following Hypocrellin-A and -B photodynamic therapy of human brain tumor cells[J]. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 2002, **298**(4): 520~530
- R. Bhuvanewari, Y. Y. Gan, S. S. Lucky *et al.*. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy[J]. *Molecular Cancer*, 2008, **7**(1): 56~70
- P. Nowak-Sliwinska, J. R. van Beijnum, M. van Berkel *et al.*. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane [J]. *Angiogenesis*, 2010, **13**(4): 281~292
- C. J. Gomer, A. Ferrario, M. Luna *et al.*. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment [J]. *Lasers Surg Med.*, 2006, **38**(5): 516~521
- S. Galbán, M. Gorospe. Factors interacting with HIF-1 α mRNA: novel therapeutic targets [J]. *Curr Pharm Design*, 2009, **15**(33): 3853~3860
- K. W. Leung, H. M. Ng, M. K. Tang *et al.*. Ginsenoside-Rg1 mediates a hypoxia-independent upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α to promote angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2011, **14**(4): 515~522