

DATS 对缝线诱导的大鼠角膜新生血管的影响及机制研究

周小军

作者单位:(461000) 中国河南省许昌市,许昌华夏眼科医院屈光科

作者简介:周小军,女,本科,主治医师,研究方向:眼表疾病及角膜屈光手术。

通讯作者:周小军. zhouxiaojun1977@126.com

收稿日期:2017-03-17 修回日期:2017-10-10

Effect of DATS on experimental corneal neovascularization induced by corneal suture in rats cornea

Xiao-Jun Zhou

Department of Refraction, Xuchang Huaxia Eye Hospital, Xuchang 461000, Henan Province, China

Correspondence to: Xiao-Jun Zhou. Department of Refraction, Xuchang Huaxia Eye Hospital, Xuchang 461000, Henan Province, China. zhouxiaojun1977@126.com

Received:2017-03-17 Accepted:2017-10-10

Abstract

• AIM: To study the effect of diallyl trisulfide (DATS) on experimental corneal neovascularization (CNV) in rats induced by corneal suture and detect the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p-AKT in rats cornea.

• METHODS: The rat model of corneal neovascularization (CNV) was induced by corneal suture. Rats were randomly divided into Group A: physiological saline control group containing DMSO (10 rats); Group B: 25 μ mol/L DATS treatment group (10 rats); Group C: 50 μ mol/L DATS treatment group (10 rats); Group D: 100 μ mol/L DATS treatment group (10 rats); Group E: 200 μ mol/L DATS treatment group (10 rats). The occurrence and development of CNV were observed by slit-lamp microscope at 7d after suture, and the area of CNV were calculated. Two weeks later, HE staining was used to observe the pathological organization form of each cornea, and RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of VEGF mRNA and protein expression of VEGF and p-AKT between each groups.

• RESULTS: The blood vessel area of Group C, D and E was compared with that of Group A, the difference was statistically significant ($P<0.05$); HE slice showed corneal edema, angiogenesis and inflammation infiltration situation gradually reduced comparing with the Group A, with the increase of concentration of DATS. RT-PCR showed the expression of VEGF mRNA in Group B, C, D,

and E decreased compared with the Group A, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Western-blot showed that the expressions of VEGF and p-AKT in Group B, C, D and E decreased gradually compared with those in Group A, and the difference was statistically significant ($P<0.05$).

• CONCLUSION: DATS can inhibit corneal neovascularization of the rats induced by suture. Its mechanism may be associated with suppression of VEGF secretion, down-regulation of VEGF and inactivation of p-AKT.

• KEYWORDS: corneal neovascularization; allicin; diallyl trisulfide; vascular endothelial growth factor; p-AKT; stitches

Citation: Zhou XJ. Effect of DATS on experimental corneal neovascularization induced by corneal suture in rats cornea. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(11):2015-2018

摘要

目的:探讨二烯丙基三硫化物(diallyl trisulfide, DATS)抑制缝线诱导的大鼠角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的生长情况,检测大鼠新生血管化角膜中 VEGF、p-AKT 的表达量,初步探讨其抑制 CNV 的可能机制。

方法:缝线法诱导大鼠 CNV 模型,随机分为 A 组:含 DMSO 的生理盐水对照组(10 只);B 组:25 μ mol/L DATS 治疗组(10 只);C 组:50 μ mol/L DATS 治疗组(10 只);D 组:100 μ mol/L DATS 治疗组(10 只);E 组:200 μ mol/L DATS 治疗组(10 只)。缝线后第 7d 裂隙灯下观察各组 CNV 的生长情况并计算面积。缝线后第 14d 取各组大鼠角膜组织行 HE 染色,光镜下观察各组角膜病理组织形态,并采用 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达情况,Western-blot 法检测 VEGF、p-AKT 蛋白表达情况。

结果:C、D、E 组的 CNV 面积分别与 A 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。HE 切片显示,与 A 组相比,B、C、D 组角膜水肿、新生血管、炎症细胞浸润情况逐渐减轻。与 A 组相比,B、C、D、E 组的 VEGF mRNA 的表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 A 组相比,C、D、E 组的 VEGF、p-AKT 蛋白的表达逐渐下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

结论:DATS 能够抑制缝线诱导的大鼠 CNV 的形成,其机制可能与抑制 VEGF 的表达及使得 p-AKT 的失活有关。

关键词:角膜新生血管;大蒜素;DATS;VEGF;p-AKT;缝线

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.11.06

引用:周小军. DATS对缝线诱导的大鼠角膜新生血管的影响及机制研究. 国际眼科杂志 2017;17(11):2015-2018

0 引言

二烯丙基三硫化物(diallyl trisulfide, DATS)是从大蒜球茎中分离出的,是大蒜抗癌活性成分有机硫化物中的一种脂溶性成分,具有多种生物活性作用,如抗真菌、抗细菌、降压、降脂、防治动脉粥样硬化、预防和治疗肿瘤。目前对 DATS 抗新生血管作用的研究还仅限于对肿瘤新生血管和人脐带静脉内皮细胞的抑制作用,而其对角膜新生血管是否有抑制作用目前在国内外尚未见报道。鉴于此,本文旨在探讨 DATS 是否对缝线诱导的大鼠角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)有抑制作用,并初步探讨其机制,为开发价廉质优的防治 CNV 的新药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康的 SPF 级 SD 雌性成年大鼠 60 只,体质量 150~200g,购于我院动物实验中心,动物合格证号 DK0503-0031。实验前均通过裂隙灯显微镜检查眼前节,排除前房穿孔、晶状体损伤脱位、玻璃体出血、虹膜出血粘连等。所有实验动物的使用、饲养及处死均按照视觉及眼科学研究协会的有关规定和我院《实验动物管理及使用指南》进行。

1.1.2 主要试剂 SYBR Green/Flourescein qPCR Master Mix(2×)(Fermentas 公司);Ex Taq TM (TAKARA 公司);DL2000 DNA Marker(TAKARA 公司);丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(AMRESCO 公司);磷酸酶抑制剂、PMSF、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司);PVDF 膜(Millipore 公司); β -actin 抗体(武汉博士德生物工程公司);血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体(Bioworld 公司);磷酸化蛋白激酶 B 抗体(p-AKT 抗体)(Bioworld 公司);HRP 标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程公司);ECL 底物液(Thermo 公司);X 光胶片(柯达公司);显影定影试剂盒(武汉巴菲尔生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 CNV 模型制作和分组 所有动物均采用双眼造模。术前剪去大鼠睫毛,腹腔注射戊巴比妥钠注射液(0.2mL/100g)进行全身麻醉,丁卡因滴眼液表面麻醉,眼周 75% 乙醇消毒,铺孔巾,参照王皓等^[7]的缝线法构建 CNV 动物模型。将 CNV 大鼠模型随机分为 A、B、C、D、E 五组,每组 10 只。A 组:给予含 DMSO 的生理盐水滴眼液;B 组:给予含 25 μ mol/L DATS 滴眼液;C 组:给予含 50 μ mol/L DATS 滴眼液;D 组:给予含 100 μ mol/L DATS 滴眼液;E 组:给予含 200 μ mol/L DATS 滴眼液。用药持续 14d,每天 1 次。

1.2.2 CNV 面积测量 所有大鼠均于缝线后第 1d 开始每日行裂隙灯显微镜检查,并于缝线后第 7d 照相,测量和计算 CNV 面积。测量时以连续弯曲度小、朝向角膜中央生长的最长血管为准,根据公式 $A = C/12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$ 计算 CNV 的生长面积(A),其中 C 为 CNV 累及角膜的圆周钟点数, l 为 CNV 从角巩膜缘深入角膜的长度, r 为角膜半径,约为 3.75mm。

1.2.3 病理组织学检测 缝线后第 14d,各组取 4 只 SD 大鼠采用腹腔注射过量戊巴比妥钠致麻醉过量死亡后,沿

角膜缘剪下完整角膜(带角巩膜缘),置于 40g/L 多聚甲醛溶液中于 4℃ 固定 12h 后将角膜沿中心一分为二继续固定 12h。常规脱水,石蜡包埋,做 4 μ m 连续切片。石蜡切片脱蜡,行苏木精-伊红染色检测。显微镜下观察并照相记录。

1.2.4 RT-PCR 检测角膜组织中 VEGF mRNA 的表达

引物由江苏南京金斯瑞生物科技有限公司设计合成。VEGF 上游引物:5'-AAGGAGGAGGGCAGAATCAT-3';下游引物:5'-ATCTGCATGGTGATGTTGGA-3',扩增片段大小 226bp。 β -actin 为内参基因,上游引物:5'-CACGATGGAGGGCCGGACTCATC-3';下游引物:5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3',扩增片段大小 240bp。缝线后第 14d 取角膜组织,采用 Trizol 法提取角膜组织总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书进行反转录,得到 cDNA,然后进行实时荧光定量 PCR 检测 VEGF 的基因表达。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因的相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 法检测角膜组织中 VEGF 和 p-AKT 的表达

缝线后第 14d 取角膜组织,预冷的 PBS 缓冲液充分洗涤 2~3 次至无血色,加入预冷的裂解液(3mL/g),剪碎标本,冰浴下匀浆器进行匀浆后在冰上孵育 30min,每隔 5min 注射器抽吸 1~2 次,使之充分混匀。4℃ 离心 30min,12000r/min。取上清,分装后于 -80℃ 低温冰箱中保存备用。采用 BCA 法检测蛋白浓度。将电泳装置电压设定为 70V,当染料前沿进入分离胶后,电压提高至 110V,继续电泳,直到溴酚蓝到分离胶底部,停止电泳。200mA,转膜 120min。含 5% 脱脂奶粉的 TBST(封闭液)封闭 2h。孵育一抗,4℃,过夜。TBST 洗膜。孵育二抗,室温,2h。TBST 洗膜。ECL 显色,曝光。用 PerkinElmer 凝胶成像系统对 X 线胶片进行拍摄。以目标条带与 β -actin 的灰度比值作为目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

统计学分析:应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数的两两比较用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜新生血管生长情况 术后第 7d,裂隙灯观察发现各组角膜新生血管增生均明显增加,血管浓密,部分血管交织呈网状。A 组较 B、C 组新生血管增生明显,管径粗大,角膜中央混浊、水肿;D、E 组的新生血管较 A、B、C 组细小,色淡,稀疏(图 1)。B 组的新生血管面积(15.36 \pm 0.46mm²)与 A 组(15.71 \pm 0.36mm²)比较,差异无统计学意义($t = 1.89, P = 0.37$);C、D、E 组的新生血管面积(14.90 \pm 0.09、12.40 \pm 0.47、9.52 \pm 0.44mm²)分别与 A 组比较,差异均有统计学意义($t = 6.91、17.68、34.43, P = 0.022、0.009、0.001$)。

2.2 组织病理学检测 术后第 14d, A 组角膜组织结构紊乱,角膜水肿较明显,基质层见大量新生血管,管腔大且密集,血管腔内可见较多成熟的红细胞,周围大量炎症细胞浸润(图 2A)。B 组角膜有轻度水肿,基质层可见新生血管及炎症细胞浸润,但较 A 组少,管腔内可见成熟的红细胞(图 2B)。C 组角膜组织结构清晰,无明显水肿,基质层内有新生血管,血管腔内可见少许的红细胞,炎症细胞浸润较 A、B 组轻(图 2C)。D 组角膜组织结构清晰,排列整

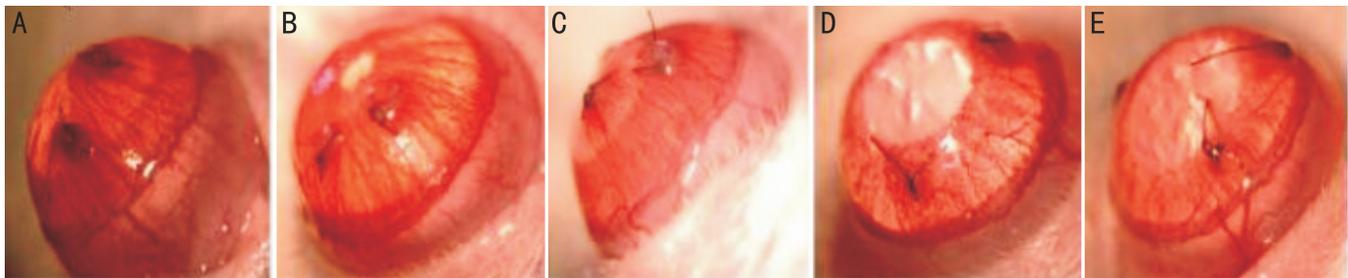


图1 术后第7d各组大鼠角膜新生血管生长情况 A:给予含DMSO的生理盐水滴眼液;B:给予含25 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;C:给予含50 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;D:给予含100 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;E:给予含200 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液。



图2 术后14d大鼠角膜组织病理切片(HE $\times 200$) A:给予含DMSO的生理盐水滴眼液;B:给予含25 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;C:给予含50 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;D:给予含100 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;E:给予含200 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液。

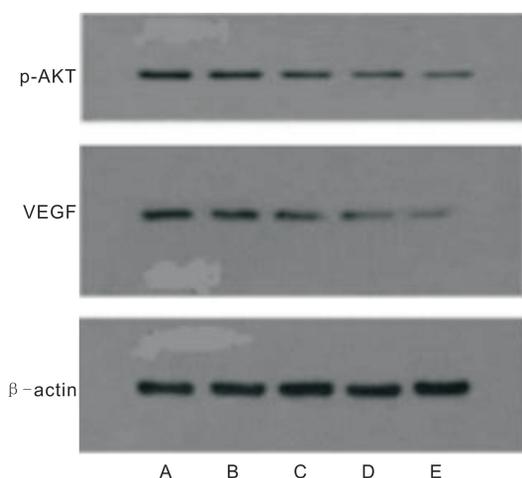


图3 术后第14d各组大鼠角膜 VEGF 和 p-AKT 蛋白表达

A:给予含DMSO的生理盐水滴眼液;B:给予含25 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;C:给予含50 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;D:给予含100 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液;E:给予含200 $\mu\text{mol/L}$ DATS滴眼液。

齐,无水肿,基质层可见较少的新生血管,血管腔细小,炎症细胞浸润明显减少(图2D)。E组角膜上皮有轻度水肿,角膜组织结构排列稍紊乱,基质层可见较少的新生血管,炎症细胞浸润较D组增多(图2E)。

2.3 角膜组织中 VEGF mRNA 的表达 RT-PCR 法检测结果显示,术后第14d,A、B、C、D、E 组各组大鼠角膜组织中 VEGF mRNA 的相对表达量分别为 1.00 ± 0.01 、 0.85 ± 0.22 、 0.72 ± 0.11 、 0.62 ± 0.04 、 0.58 ± 0.09 。与 A 组比较,B、C、D、E 组 VEGF mRNA 的表达水平均降低,差异均有统计学意义($t = 2.25$ 、 8.02 、 29.14 、 14.66 , $P = 0.044$ 、 0.011 、 0.001 、 0.004)。

2.4 角膜组织中 VEGF 和 p-AKT 蛋白表达 Western blot 法检测结果表明,术后第14d,各组大鼠角膜组织中 VEGF 蛋白的表达量分别为 0.41 ± 0.06 、 0.36 ± 0.07 、 0.29 ± 0.06 、 0.21 ± 0.04 、 0.19 ± 0.03 ,B、C、D、E 组分别与 A 组比较,VEGF 的表达量均降低,差异均有统计学意义($t = 2.36$ 、 4.40 、 8.77 、 10.37 , $P = 0.046$ 、 0.038 、 0.013 、 0.001)。各组大鼠角膜组织中 p-AKT 蛋白的表达量分别为 0.41 ± 0.03 、 0.42 ± 0.05 、 0.36 ± 0.04 、 0.34 ± 0.05 、 0.29 ± 0.06 ,

C、D、E 组分别与 A 组比较,p-AKT 的表达量均降低,差异均有统计学意义($t = 2.19$ 、 3.78 、 7.24 , $P = 0.047$ 、 0.041 、 0.015),B 组与 A 组比较差异无统计学意义($t = 0.41$, $P = 0.867$),见图3。

3 讨论

CNV 动物模型的成功建立是研究 CNV 调控机制和评价其防治方法的重要手段。常用的酸碱化学烧灼法,操作简单,取材方便,可以较好地诱导 CNV 模型,但存在烧灼深度及范围不能较好控制等问题^[1]。研究显示,缝线法较碱烧灼法能够更容易控制角膜新生血管生长的方向、范围、长度、深度,便于观察和测量。角膜囊袋植入法诱导的 CNV 模型,血管生长定向性好,且个体间差异性小,但存在对器械要求高、药物配制及包埋过程较为复杂等不利因素^[2]。大鼠 CNV 模型具有经济、易操作、重复性好等优点,成为目前研究中应用最普遍的动物模型。缝线法诱导 CNV 模型的制作较简单,并且经济实惠,因此,本实验选择缝线法诱导大鼠 CNV 的产生。本实验建立的大鼠 CNV 模型形成的时间、生长方向及生长速度等结果均较好。

越来越多的研究证实,CNV 伴随 VEGF 的过度表达。有学者通过机械除去角膜和角膜缘上皮,诱导 CNV 模型中发现:正常角膜组织中 VEGF mRNA 呈低水平表达,CNV 模型 VEGF mRNA 表达显著增高达 10 倍以上^[3]。也有相关学者同样证实了 CNV 的出现会伴随 VEGF mRNA 和蛋白水平明显增高,且 VEGF 中和抗体能有效地抑制 CNV 的形成^[4]。Akt 是一种由 480 个氨基酸残基组成的蛋白激酶,又称丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它能够与含有 RXXR(S/T)氨基酸序列(R 代表精氨酸;X 代表任何氨基酸;S/T 为丝氨酸/苏氨酸)的底物结合,使其磷酸化,从而发挥生物学功能。目前发现 3 种 Akt 家族成员: Akt1/PKBa、Akt2/PKBb 和 Akt3/PKBg。Akt 是 PI3K 的主要下游效应分子之一,PI3K-Akt 信号通路的激活与多种肿瘤如乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肝癌、卵巢癌及淋巴瘤的发生密切相关。我们知道,肿瘤的生长和转移与新生血管密切相关,肿瘤生长到一定程度时,就必须依靠新生血管来维持生长。在 PI3K-Akt 信号通路激活过程中,PI3K 活化产生重要的第二信使 PIP3,它能够活化 Akt,从而促进肿瘤血管形成,具体机制为:活化的 Akt 使得内皮型一氧

化氮合酶(eNOS)磷酸化,使之处于激活状态,产生NO,通过NO来刺激血管舒张和血管形成^[5]。另外,有研究发现,PI3K/AKT信号通路通过多种途径使得低氧诱导因子(HIF-1 α)的表达上调。缺氧状态下,HIF-1 α 可与VEGF启动子结合,促进VEGF mRNA的转录,从而促进肿瘤血管形成^[6-7]。国内学者^[8]在研究PI3K-Akt信号通路与胃腺癌中HIF-1 α 和VEGF表达的关系时发现,大部分肿瘤组织中可检测到p-Akt表达,使用PI3K通路抑制剂LY294002后检测到p-Akt、VEGF水平下降。由此可推出,VEGF可通过自身和活化PI3K-Akt信号通路2种方式来促进血管生成。

DATS亦称为大蒜新素,是一种从百合科植物大蒜的鳞茎中提取的有机硫化物。大量研究表明DATS能够降血脂、降血压、降血糖,调节免疫力,发挥抗衰老、抗感染及抗肿瘤等多重功效^[9]。流行病学及实验研究证实,DATS能明显抑制血液系统肿瘤和实体肿瘤^[10-11]。DATS能够使前列腺癌细胞的凋亡相关分子如caspase-3、Bcl-2的表达减少,阻滞前列腺癌细胞G2/M期,促进细胞凋亡,从而减弱其增殖能力。DATS还可通过降低基质金属蛋白酶(MMP)-2、-7、-9的表达和活性,降低结肠癌细胞侵袭转移能力。有学者在观察DATS对人肝癌细胞VEGF mRNA表达的影响的研究中发现,与对照组相比,用药组VEGF mRNA表达水平降低约66.36% ($P < 0.05$)^[12]。有研究证实,20mg/L的DATS可显著抑制人乳腺癌高转移细胞株MDA-MB-231细胞的侵袭能力,其侵袭抑制率为33.27%,并认为其机制可能与降低肿瘤细胞的MMP-2、-9和VEGF有关^[13]。Gao等^[14]亦证实DATS可下调VEGF mRNA的表达,从而抑制结肠癌细胞的浸润和转移。由此可知,DATS可以通过下调VEGF的表达,从而抑制肿瘤效应。Xiao等^[15]研究认为,DATS抑制血管内皮细胞的增殖及VEGF的表达下降,可能与AKT蛋白激酶失活有关。有趣的是,我们的体内实验结果亦进一步证实了这一观点,我们的研究结果发现,与对照组相比,随着DATS药物浓度的逐渐增大,对大鼠CNV的抑制能力越强,对CNV面积、HE切片的观察均证实这点。RT-PCR检测VEGF mRNA结果发现与对照组相比,VEGF mRNA的表达下降呈剂量依赖性。Western blot检测发现,与对照组相比,VEGF、p-AKT表达均随药物浓度的升高而降低。由此我们初步认为,DATS能够抑制缝线诱导的大鼠CNV的形成,其机制可能与下调VEGF及p-AKT有关。更有趣的是,我们发现,100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的DATS对大鼠CNV均有较好的抑制作用,但病例检测发现,200 $\mu\text{mol/L}$ 的DATS对大鼠角膜组织的损伤较大,因此推测,可能大

鼠角膜能够承受的药物浓度应该小于200 $\mu\text{mol/L}$ 。

综上所述,本文研究发现,DATS能够抑制缝线诱导的大鼠CNV的形成,其机制可能与下调VEGF和p-AKT有关。DATS是一种天然化合物,且能够将来源广泛、物美价廉、低毒性、多靶点治疗等优点完美结合,有望成为预防及治疗CNV的潜在的理想药物。

参考文献

- 1 张淑锬,谢平,袁冬青,等. 实验性脉络膜新生血管形成过程中巨噬细胞及单核细胞趋化蛋白-1的作用. 中华实验眼科杂志 2015;33(12):1095-1101
- 2 顾顺,武志峰. 动物眼部新生血管模型的研究进展. 国际眼科纵览 2013;37(1):43-47
- 3 王群. 角膜新生血管治疗中以VEGF/VEGFR为靶点药物的研究进展. 中华实验眼科杂志 2015;33(12):1138-1143
- 4 李颖,杨磊,宋艳萍,等. 角膜基质细胞诱导分化的脂肪间充质干细胞羊膜片移植治疗兔角膜碱烧伤的疗效及其机制. 中华实验眼科杂志 2015;33(6):500-506
- 5 Yu S, Wong SL, Lau CW, et al. Oxidized LDL at low concentration promotes *in-vitro* angiogenesis and activates nitric oxide synthase through PI3K/Akt/eNOS pathway in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;407(1):44-48
- 6 陈冬茹,吴莉萍. 低氧诱导因子-1 α 和反义低氧诱导因子-1 α 的研究进展. 国际口腔医学杂志 2016;43(5):589-593
- 7 王皓,李湛,郝玉忠,等. 突变型低氧诱导因子1 α 加速骨缺损部位新血管生成的实验观察. 西安交通大学学报(医学版) 2015;36(4):455-461
- 8 李能莲,张煦,王雅莉,等. 缺氧诱导因子及其应答基因BNIP3和血管内皮生长因子在胃腺癌中表达及临床意义. 中华肿瘤杂志 2008;30(1):44-47
- 9 杨融辉,吴晗,张宁,等. 大蒜素抗氧化活性及其生物效应的研究进展. 东南大学学报(医学版) 2015;34(6):1037-1040
- 10 丛利家,张小洁,范红艳,等. 大蒜素抗肿瘤作用的研究进展. 吉林医药学院学报 2015;36(3):225-228
- 11 Padilla-Camberos E, Zaitseva G, Padilla C, et al. Antitumoral activity of allicin in murinelymphoma L5178Y. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11(5):1241-1244
- 12 王若天,邝健辉. 大蒜素联合替加氟对人HepG2肝癌细胞增殖的影响. 中国生化药物杂志 2012;33(4):453-454
- 13 余乐涵,万慧芳,涂硕,等. 大蒜素联合紫杉醇对人乳腺癌细胞增殖的影响及其机制. 南昌大学学报(医学版) 2015;55(5):26-31
- 14 Gao Y, Liu Y, Cao W, et al. Effects of allicin on invasion and metastasis of colon cancer LoVo cell line *in vitro*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009;89(20):1382-1386
- 15 Xiao D, Li M, Herman-Antosiewicz A, et al. Diallyl trisulfide inhibits angiogenic features of human umbilical vein endothelial cells by causing Akt inactivation and down-regulation of VEGF and VEGF-R2. *Nutr Cancer* 2006;55(1):94-107