

综述

胚胎发育中血管新生的研究

高成¹ 闫小毅¹ 卓巍¹ 朱飏² 周天华^{1*}(¹浙江大学基础医学院细胞生物学系, 杭州 310058; ²浙江省人民医院, 杭州 310058)

摘要 在胚胎发育中, 心血管系统最早发育并发挥运输氧和营养物质的功能。在原肠运动时期, 中胚层细胞在相邻内胚层细胞信号的诱导下分化产生内皮细胞, 从而开始形成血管系统。血管新生是形成完整血管系统的重要过程, 主要包括出芽式血管新生和套叠式血管新生两种方式。出芽式血管新生最为普遍, 主要包括基底膜的降解、内皮细胞的迁移和增殖、管腔形成和血管的成熟与稳定四步。由于血管新生对胚胎发育以及许多生理过程均发挥重要作用, 血管新生受到多条信号通路的精密调控。该文从内皮细胞的来源、血管新生的过程及信号调控三个方面就近年来胚胎发育中血管新生的研究作简要综述。

关键词 胚胎发育; 内皮细胞; 血管新生; 信号转导

The Progress of Embryonic Angiogenesis

Gao Cheng¹, Yan Xiaoyi¹, Zhuo Wei¹, Zhu Biao², Zhou Tianhua^{1*}*(¹Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;**²Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310024, China)*

Abstract Cardiovascular system is essential for the transport of oxygen and nutrients to tissues. Therefore, cardiovascular system is the first organ to develop and reach a functional state during embryogenesis. Blood vessel formation initiates during gastrulation, wherein mesoderm cells differentiate into endothelial cells by the inducing signals from the endoderm. Angiogenesis is a critical event for the formation of the vascular network, which contains two models: sprouting angiogenesis and intussusceptive angiogenesis. Sprouting seems to be the most extensive mechanism, which undergoes the following progression: the destruction of the basement membrane, the migration and proliferation of endothelial cells, lumen formation, vessel maturation and stabilization. This paper reviews the progress of embryonic angiogenesis in recent years from three aspects: the origin of endothelial cells, the process of angiogenesis and the regulation of angiogenesis.

Keywords embryogenesis; endothelial cells; angiogenesis; signal transduction

收稿日期: 2014-12-05 接受日期: 2015-02-05

国家科技部重大科学研究计划(批准号: 2012CB945004)、国家自然科学基金重大项目(批准号: 31190063)和浙江省实验动物科技计划(批准号: 2012C37089)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88208257, E-mail: tzhou@zju.edu.cn

Received: December 5, 2014 Accepted: February 5, 2015

This work was supported by the National Basic Research Program of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2012CB945004), the Major Program of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31190063) and the Laboratory Animal Science and Technology Program of Zhejiang Province (Grant No.2012C37089)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88208257, E-mail: tzhou@zju.edu.cn

网络出版时间: 2015-04-23 14:53 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150423.1453.004.html>

胚胎发育是指受精卵在严格地调控下经过一系列的细胞分裂和分化发育成完整个体的过程。在脊椎动物中, 心血管系统(cardiovascular system)是首先开始发育并发挥功能的系统, 这为其他系统的发育提供了必需的营养来源^[1]。心血管发育的一个重要方面就是内皮细胞的产生, 并随后组织形成复杂的包含动脉、静脉和毛细血管的网络结构。胚胎发育时期, 血管系统形成主要包括两个过程: 血管生成(vasculogenesis)和血管新生(angiogenesis)。血管生成又称为血管形成, 是指由中胚层细胞(mesoderm cells)分化产生的内皮细胞相互聚集而组织形成原始的毛细血管丛(vascular plexus)的过程(图1A和图1B)。血管生成是血管从无到有的过程, 主要发生在胚胎发育早期^[2]。血管新生是在原有血管的基础上, 在血管新生因子刺激下由内皮细胞经增殖和迁移而形成新的血管(图1C)^[3]。血管新生不仅在胚胎发育中发挥重要功能, 而且在成熟个体生理或病理状态下(如创伤修复、肿瘤、自身免疫性疾病、内分泌疾病、炎症等)普遍存在, 并扮演了极其关键的角色^[4]。本文主要对胚胎发育中内皮细胞的来源、血管新生的过程及信号调控作简要综述。

1 内皮细胞的来源

在哺乳动物中, 血管新生首先发生在卵黄囊(yolk sac)和滋养层(trophoblast)。这是因为在胚胎发育早期, 营养供应是首先要解决的问题。起初, 胚胎所需要的营养主要以自由扩散的方式获得, 但这种方式只能扩散100~200 μm 的距离。高度发达的脉管系统能够确保所有细胞都能够获得充足的营养供应^[5]。血管主要由内皮细胞(endothelial cells)和壁细胞(mural cells)组成, 其中内皮细胞形成了血管内壁, 构成血管的管腔结构; 壁细胞附着在内皮细胞上, 维持了血管的稳定。

在血管发育过程中, 内皮细胞由中胚层细胞分化而来。绝大部分的壁细胞也来源于中胚层, 还有少部分来源于神经嵴细胞。在原肠运动时期, 尾部的外胚层细胞(epiblast cells)向原条迁移形成中胚层后, 内皮细胞开始分化形成^[6]。中胚层细胞首先分化为成血血管细胞(hemangioblasts), 成血血管细胞具有分化为造血干细胞(hematopoietic stem cells)和成血管细胞(angioblasts)的能力。新产生的成血管细胞具有分化为内皮细胞的潜能, 但许多内皮细胞的标

记性蛋白尚未表达。成血管细胞有很强的迁移能力, 当其迁移到达适当的位置后, 成血管细胞停止迁移, 同时开始表达VE-cadherin并相互连接。此时, 成血管细胞转变为增殖内皮细胞(proliferative endothelial cells)。经过进一步的成熟, 增殖内皮细胞失去增殖能力形成成熟的内皮细胞(图1A)^[6-7]。中胚层细胞特异性分化为内皮细胞的过程受到许多信号通路的调控, 特别是来自于相邻内胚层细胞分泌的信号分子, 如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、印度刺猬因子(indian hedgehog, IHH)、骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等。FGF和BMP4的缺失将导致中胚层发育缺陷, 进而影响内皮细胞的产生^[8-9]。VEGF和IHH信号通路虽然不影响中胚层的形成, 但在中胚层的细胞分化和谱系定向中发挥了关键作用^[10-11]。

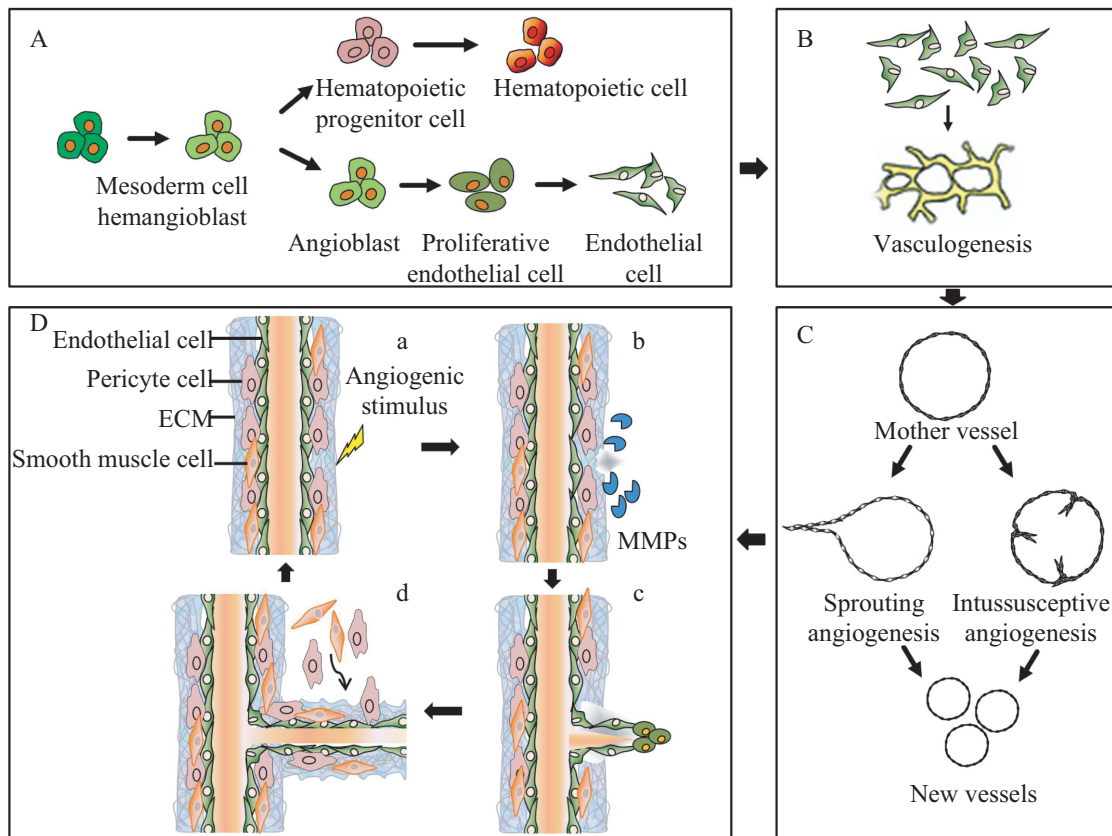
2 血管新生的过程

2.1 血管新生的类型

血管新生是一个多信号介导的多细胞参与的复杂生物学过程。目前, 根据新血管产生的过程, 可将血管新生分为出芽式血管新生(sprouting angiogenesis)和套叠式血管新生(intussusceptive angiogenesis)(图1C)。出芽式血管新生发现最早也研究得最为清楚, 其特点是内皮细胞在成血管因子的刺激下以出芽的方式向外生长。这种方式能够使血管向没有血管的组织中生长, 是最为普遍的一种血管新生方式。套叠式血管新生由Burri等^[12]于1990年发现。套叠式血管新生主要由血管壁上相对的内皮细胞向管腔内生长, 形成双层内皮细胞, 随后双内皮细胞层及基底膜发生穿孔, 血管平滑肌细胞和周皮细胞被招募, 从而形成两个新的血管^[13]。这种方式主要发生在毛细血管新生中。目前文献中所指的血管新生主要是指出芽式血管新生。

2.2 出芽式血管新生的过程

2.2.1 血管基底膜的降解 出芽式血管新生是内皮细胞以出芽的方式向外生长。内皮细胞向外迁移生长首先需要突破基底膜。在血管新生刺激因子如Ang2(angiopoietin 2)、bFGF、VEGF和IGF-1等的刺激下, 多种蛋白酶被释放以降解基质蛋白。这些蛋白酶主要包括纤溶酶原激活剂家族(plasminogen activator)、基质金属蛋白酶家族(matrix metallopro-



A: 内皮细胞的来源; B: 血管生成; C: 出芽式血管新生和套叠式血管新生; D: 出芽式血管新生的过程。a、b: 血管基底膜的降解; c: 内皮细胞的迁移、增殖和管腔形成; d: 血管的成熟。ECM: 细胞外基质; MMPs: 基质金属蛋白酶。

A: origin of endothelial cells; B: vasculogenesis; C: sprouting angiogenesis and intussusceptive angiogenesis; D: the process of sprouting angiogenesis. a,b: local degradation of the vascular basement membrane; c: endothelial cell proliferation, migration and lumen formation; d: vessel maturation. ECM: extracellular matrix; MMPs: matrix metalloproteinases.

图1 血管新生的过程(根据参考文献[6,14-15]作适当修改)

Fig.1 Process of angiogenesis (modified from references [6,14-15])

teinasase)、糜蛋白酶家族(chymase)和乙酰肝素酶家族(heparanase)^[16]。在这些蛋白酶的作用下,内皮细胞之间和内皮细胞与周围组织之间的连接变得松散,这为内皮细胞的迁移提供了必要的环境条件。

2.2.2 内皮细胞的迁移和增殖 在促血管新生因子如VEGF的刺激下,位于基底膜降解区域的内皮细胞开始伸出丝状伪足(filopodia)向外迁移,这类内皮细胞被称为Tip cells^[17]。Tip cells不能够增殖或很少增殖,但其能感知外界信号,并通过动态地伸出伪足以确定迁移方向,这也确定了出芽式血管新生的方向。其他的内皮细胞紧跟着Tip cells进行迁移,称为Stalk cells。在周围的血管新生相关信号因子作用下,Stalk cells获得增殖能力,进入细胞周期开始大量增殖^[18]。内皮细胞的迁移和增殖是出芽式血管新生的关键步骤。机体内存在许多血管新生诱导因子与抑制因子,这些调节因子之间的平衡调控着内皮细胞

的迁移和增殖行为,保证了血管新生顺利完成。

2.2.3 新生血管管腔形成 血管腔(vascular lumen)的形成是一个动态过程,目前主要的模型是cord-hollowing^[19-20]。内皮细胞通过黏着连接(adherens junction)相互连接,形成索状结构(endothelial cell cord)。随后,细胞连接发生重塑,产生紧密连接(tight junction)导致内皮细胞极化,并在索状结构中央形成一个小的缝隙,血流进入缝隙形成管腔^[20-21]。管腔的形成与细胞连接密切相关,敲除黏着连接的关键蛋白VE-cadherin和紧密连接的重要蛋白闭锁小带蛋白-1(zonula occludens protein-1, ZO-1)都会导致小鼠由于血管新生缺陷而胚胎致死^[22-23]。

2.2.4 血管的成熟 内皮细胞组装成血管后会退出细胞周期,进入静息状态,而此时的血管是不成熟的。新产生的血管会通过招募壁细胞和产生胞外基质来维持其稳定。在内皮细胞分泌的PDGF-

B(platelet-derived growth factor-B)的诱导下,平滑肌细胞和周皮细胞等壁细胞会被招募到内皮细胞上^[14]。*PDGF-B*敲除后,小鼠在胚胎发育过程中会因血管缺乏周皮细胞的招募而死亡。VEGF通过促进PDGF-B的分泌或直接与VEGF受体结合^[24],从而促使壁细胞被招募。TGF-beta信号也参与了血管的成熟,其主要作用包括抑制内皮细胞的迁移和增殖、促进平滑肌细胞的分化和刺激胞外基质的分泌^[25]。

3 血管新生的调控

血管新生涉及多种细胞,是细胞与细胞、细胞与胞外基质相互作用的结果,因此血管新生受到严格调控。由于小鼠胚胎发育与人类高度相似,随着对小鼠的基因操作技术包括敲除、敲入和突变等的成熟,小鼠已成为研究血管新生的良好动物模型。许多血管发育缺陷的突变小鼠品系的建立为详细研究和分析在血管新生中单基因的功能以及多基因之间的相互关系提供了有利的工具。目前的研究主要包括:VEGF信号通路、Ang-Tie信号通路、Notch信号通路、TGF-beta信号通路、EphrinB-EphB信号通路和PDGF信号通路等^[26](图2)。

3.1 VEGF信号通路

VEGF最初由Senger于1983年发现其能够强烈地调控血管通透性,而被称为血管通透因子(Vascular permeability factor, VPF)^[27]。随后的研究发现,其能够特异性促进内皮细胞增殖^[28]。VEGF家族主要包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E

和PlGF(placental growth factor)。其中,VEGF-A最早被发现也研究得最多,其参与了血管生成和血管新生。VEGF敲除小鼠由于严重的心血管发育缺陷而使胚胎致死,甚至杂合子胚胎也会由于背动脉缺陷在E11.5天胚胎致死^[29]。有趣的是,过表达VEGF也会发生胚胎致死^[30]。VEGF受体属于受体酪氨酸激酶家族,包括VEGFR1(Flt1)、VEGFR2(Flk1)和VEGFR3(Flt4)。当VEGF配体与相对应的受体结合后,受体发生二聚化激活其激酶活性,使得受体发生自磷酸化从而激活下游信号通路^[1]。

VEGFR2是VEGF的主要受体,其在内皮细胞迁移、分化、增殖和存活等过程中均发挥了关键性作用。敲除*VEGFR2*的胚胎由于血管发育缺陷在E9.5天死亡^[31]。VEGFR2在血管发育过程中发挥多种生物学功能,主要是通过磷酸化VEGFR2受体胞内段的不同酪氨酸残基来实现的^[32]。例如,磷酸化Tyr1175位点后,VEGFR2会与PLC- γ 结合从而激活MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号通路,促进内皮细胞增殖。另外,PLC- γ 会诱导钙离子释放并激活PKC通路,促进NFAT和EGR-1等转录因子的功能,从而触发血管新生的一系列反应。PLC- γ /PKC通路也会通过激活PKD而磷酸化HDAC7(histone deacetylase 7),从而促进内皮细胞的增殖和迁移。此外,PI3K的接头蛋白(adaptor protein) SHB也会和VEGFR2的Tyr1175位点结合,从而激活PI3K。PI3K会进一步激活Akt/PKB通路,从而调控内皮细胞的迁移和存活以及血管的通透性。Tyr1214位点磷酸

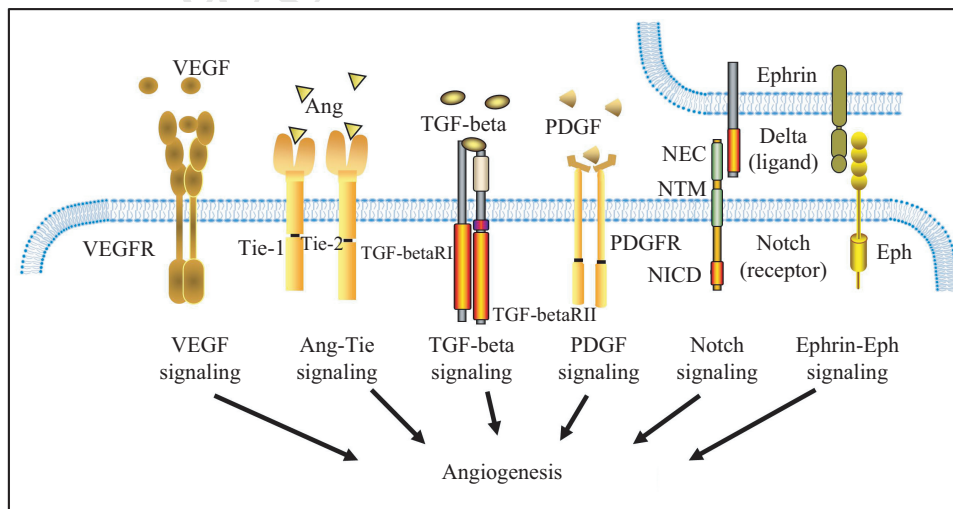


图2 血管新生相关的信号通路

Fig.2 Key signaling pathways in angiogenesis

化会激活Cdc42和p38-MAPK调控微丝骨架重塑,从而促进内皮细胞的迁移。

3.2 Ang-Tie信号通路

Ang-Tie信号通路主要在血管重塑、壁细胞的招募和血管成熟等过程中发挥重要作用^[33]。在90年代早期,人们在寻找内皮细胞中表达的酪氨酸激酶时发现了两个受体酪氨酸激酶Tie-1和Tie-2。随后人们发现了与Tie-2结合的配体血管生成素(angiopoietin, Ang),主要包括四个成员:Ang1、Ang2、Ang3和Ang4,其中Ang1和Ang2的功能研究得较为清楚。而到目前为止,Tie-1的特异性配体尚未发现。Ang1主要由血管平滑肌细胞、周皮细胞和成纤维细胞等血管周围细胞分泌^[34]。Ang1能够形成多聚体,并与其受体Tie-2结合而激活其酪氨酸激酶活性。激活的Tie-2能够引发下游一系列的信号传导,包括激活PI3K通路而促进内皮细胞的存活,激活Akt、eNOS、MAPK和Pak等信号通路。另外,Tie-2也会通过招募ABIN-2(A20-binding inhibitor of NF- κ B 2)而抑制NF- κ B通路,从而抑制内皮细胞的凋亡。*Tie-2*和*Ang1*基因敲除后会使胚胎致死,且表型十分类似,包括血管扩张、成熟的血管网络不能形成、血管缺乏平滑肌细胞和周皮细胞的支持^[35]。Ang2主要由内皮细胞分泌并与Tie-2结合,然而Ang2与Tie-2结合后并不能够激活Tie-2。随后的研究也表明,Ang2可与Ang1竞争性结合Tie-2从而抑制Tie-2通路的激活^[36]。在胚胎中过表达Ang2导致的表型与*Tie-2*和*Ang1*基因敲除的表型一致,也说明Ang2能够抑制Tie-2通路。近年来的研究表明,Ang2能够不依赖于Tie-2而直接作用于内皮细胞。Ang2可以与内皮细胞上的一些整合素结合,然后诱导FAK的磷酸化,激活Rac1,发挥促进细胞迁移和血管新生的功能^[37]。

3.3 Notch信号通路

在哺乳动物中,目前已发现的Notch信号通路配体有五个:Jagged1、Jagged2、Dll1、Dll3和Dll4,与其他信号通路不同的是,Notch的配体都是跨膜蛋白。Notch受体有四个(Notch 1、2、3和4),其分子结构由胞外段(Notch extracellular domain, NEC)、跨膜段(Notch transmembrane fragment, NTM)和胞内段(Notch intracellular cytoplasmic domain, NICD/ICN)三部分组成。Notch信号的激活过程是:相邻细胞的Notch配体与受体相互作用,Notch受体蛋白通过三次剪切,胞内段(NICD)被切断而释放到胞质,进而入

核与特异性的转录因子CSL结合,形成NICD/CSL转录激活复合体,从而激活下游靶基因如*HES*、*HEY*等的表达^[38]。

在血管系统中,Notch1和Notch4在内皮细胞中表达,而Notch3主要在血管平滑肌中表达^[39]。在小鼠中敲除*Notch1*基因会导致严重的体节发育缺陷和心血管异常,纯合子在胚胎发育第9.5天致死^[40]。尽管敲除*Notch4*后小鼠没有任何异常,*Notch1*和*Notch4*同时敲除后,小鼠会比仅敲除*Notch1*有更加严重的表型。此外,在内皮细胞中过表达激活型Notch4会导致血管缺陷并胚胎致死^[41]。敲除Notch的配体同样也会导致严重的血管发育缺陷。缺失Jagged-1后,胚胎血管重塑发生缺陷,卵黄囊上血管不能形成,胚胎在第10.5天死亡^[42]。*Dll4*敲除的杂合子会由于单倍型剂量不足而导致严重的血管发育缺陷^[43]。

在人类遗传性疾病中也证实,Notch信号通路参与了血管的形成。伴皮层下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL)主要是由于Notch3的突变从而导致动脉周围的平滑肌细胞退化引发的疾病,其主要症状包括中风、偏头痛和渐进性痴呆^[44]。Jagged-1突变会导致Alagille综合征,这种综合征的主要表现为血管形成异常、动脉狭窄、心脏病以及肝脏和骨骼的病变^[45]。

3.4 TGF-beta信号通路

TGF-beta信号通路在胚胎发育早期就开始表达并发挥重要功能。通过基因敲除等方法,现已发现许多TGF-beta信号通路的组分缺失会导致严重的心血管发育缺陷,因而其在血管新生中的功能备受关注。TGF-beta信号通路调控了内皮细胞和血管平滑肌细胞的迁移、增殖、存活、分化和胞外基质的分泌,同时还能够维持血管的稳态。TGF-beta蛋白家族主要包括TGF-betas、BMPs(bone morphogenic proteins)、activins和inhibins。TGF-beta蛋白与细胞膜上的I型和II型丝/苏氨酸激酶受体结合,I型受体被II型受体磷酸化。磷酸化的I型受体具有激酶活性,能够磷酸化Smad蛋白促进其进入细胞核发挥转录因子功能,激活下游靶基因的表达。

在体外,用TGF-beta1处理内皮细胞时发现,其既能促进又能抑制内皮细胞的增殖和迁移。通过

基因敲除等方法人们发现, 当TGF- β 与I型受体ALK1结合时, Smad1/5被激活而促进了内皮细胞的迁移和增殖; 然而当TGF- β 与I型受体ALK5结合后, Smad2/3被激活反而抑制了内皮细胞的迁移和增殖^[15]。因此, 虽然敲除ALK1和ALK5后都会导致胚胎血管新生缺陷, 但它们的分子机制是完全不同的^[46]。TGF- β 的双重作用使得其在血管新生的不同时期均发挥了关键作用。在血管新生的初期, 基底膜被降解, 内皮细胞发生迁移和增殖, ALK1通路被激活, 通过激活*Id1*等靶基因的表达发挥促进血管新生的功能。此外, ALK1通路也会促进内皮细胞分泌其他的促血管新生因子, 通过间接的方式促进血管新生^[47]。在新生血管成熟时, ALK5通路被激活, 从而抑制内皮细胞的增殖和迁移, 并促进细胞外基质的分泌, 同时也会招募平滑肌细胞, 实现促进血管成熟的功能^[48]。

3.5 Ephrin-Eph受体信号通路

Ephrin-Eph信号通路调控了许多生物学过程, 包括胚胎模式的形成、神经元的定位、上皮细胞的分化和血管发育等^[49]。Eph受体属于受体酪氨酸激酶家族, 包含14个成员。Eph配体Ephrin目前已发现了8种, 与其他可溶性配体不同的是, Ephrin是膜蛋白。由于Ephrin和Eph都是膜蛋白, 这条信号通路的激活依赖于细胞与细胞之间的接触。正是由于这种特性, Ephrin-Eph信号能够双向传导。以Ephrin为配体, 激活Eph受体, 继而激活下游的Ras、Rac、Rho和FAK等分子发挥生物学效应, 此为正向信号传导^[50]。以Eph为配体激活Ephrin受体, 通过Ephrin招募支架蛋白Grb4进而激活JNK、WNT和FAK等分子, 此为反向信号传导^[51], 但其具体机制仍然不是十分清楚。基因敲除Ephrin B2和EphB4都会导致胚胎在第10.5天由于血管重塑异常和动脉静脉发育缺陷而致死^[52]。

3.6 PDGF信号通路

PDGF信号通路主要调控了血管的成熟。PDGF家族与VEGF家族在蛋白结构上十分相似, 但是其表达模式和功能明显不同。PDGF及其酪氨酸激酶在成纤维细胞、平滑肌细胞、神经元和内皮细胞等多种类型的细胞中表达, 并发挥了广泛的作用^[53]。PDGF是由两条高度同源的A链和B链组成的同源或异源二聚体, 包含PDGF-AA、PDGF-BB和PDGF-AB三种形式。其受体属于受体酪氨酸激酶家族, 同

样也是由alpha和beta两个亚单位构成的同源或异源二聚体^[54]。敲除PDGF-B基因后会导致毛细血管的周皮细胞和平滑肌细胞减少, 血管变得十分脆弱并出血, 随后将导致胚胎死亡^[55]。在小鼠中PDGFR-beta敲除会导致血管平滑肌和周皮细胞的增殖受到抑制^[56]。

4 总结与展望

建立完整的血管系统对于胚胎的正常生长和发育有重要意义。在胚胎发育中, 由中胚层细胞分化而来的内皮细胞首先经过血管生成形成原始的毛细血管丛。随后在一系列的信号通路的调控下, 原始的毛细血管丛重塑形成成熟的血管网络。同时, 在已有血管的基础上, 内皮细胞以出芽或套叠的方式产生新的血管。

血管新生涉及多种细胞的协同作用, 因此通过简单地培养内皮细胞来研究血管新生有很大的局限性。小鼠胚胎发育过程中包含着丰富的血管发育过程, 这为研究血管新生提供了良好的动物模型。近年的一些研究通过利用小鼠模型也发现了许多血管新生的新型调控机制, 例如microRNA、LncRNA、表观遗传等, 这都进一步丰富了我们对于血管新生的认识。由于血管新生调控的复杂性和多样性, 如何理解这些调控机制之间的网络关系对于我们进一步深层次地认识血管新生有重要意义, 这同时也是目前所面临的挑战。

在成体中, 许多生理和病理过程都伴随着血管新生。血管新生作为癌症的hallmark^[57], 对于肿瘤的发生发展有重要作用。抑制血管新生已成为治疗肿瘤的重要手段。通过研究胚胎发育过程中血管新生的调控机制, 将有助于我们全面地考虑治疗策略, 提高治疗效率; 同时, 也将有助于我们去寻找新的药物靶点。因此, 如何将这些血管新生机制研究与临床结合, 制定新型治疗策略和个性化医疗将是未来对血管新生研究的重要方向。

参考文献 (References)

- 1 Wilting J, Christ B. Embryonic angiogenesis: A review. *Naturwissenschaften* 1996; 83(4): 153-64.
- 2 Nelson KS, Beitel GJ. More than a pipe dream: Uncovering mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell* 2009; 17(4): 435-7.
- 3 Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473(7347): 298-307.

- 4 Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6): 653-60.
- 5 Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56(4): 549-80.
- 6 Goldie LC, Nix MK, Hirschi KK. Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis* 2008; 4(4): 257-63.
- 7 Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res* 2007; 101(2): 125-36.
- 8 Dorey K, Amaya E. FGF signalling: Diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 2010; 137(22): 3731-42.
- 9 Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett* 2012; 586(14): 1993-2002.
- 10 Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes Dev* 2008; 22(18): 2454-72.
- 11 Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24(2): 188-93.
- 12 Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 1990; 228(1): 35-45.
- 13 Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* 2009; 12(2): 113-23.
- 14 Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6(4): 389-95.
- 15 Orlova VV, Liu Z, Goumans MJ, ten Dijke P. Controlling angiogenesis by two unique TGF-beta type I receptor signaling pathways. *Histol Histopathol* 2011; 26(9): 1219-30.
- 16 Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9(2): 267-85.
- 17 Siemerink MJ, Klaassen I, van Noorden CJ, Schlingemann RO. Endothelial tip cells in ocular angiogenesis: Potential target for anti-angiogenesis therapy. *J Histochem Cytochem* 2013; 61(2): 101-15.
- 18 Carmeliet P, de Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: Tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6(6): 315-26.
- 19 Sigurbjornsdottir S, Mathew R, Leptin M. Molecular mechanisms of *de novo* lumen formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(10): 665-76.
- 20 Strilic B, Kucera T, Eglinger J, Hughes MR, McNagny KM, Tsukita S, *et al.* The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell* 2009; 17(4): 505-15.
- 21 Herbert SP, Huisken J, Kim TN, Feldman ME, Houseman BT, Wang RA, *et al.* Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: An alternative mode of blood vessel formation. *Science* 2009; 326(5950): 294-8.
- 22 Luo Y, Radice GL. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2005; 169(1): 29-34.
- 23 Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, *et al.* Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 2008; 19(6): 2465-75.
- 24 Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, *et al.* Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 1999; 5(5): 495-502.
- 25 van Meeteren LA, Goumans MJ, ten Dijke P. TGF-beta receptor signaling pathways in angiogenesis; emerging targets for anti-angiogenesis therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12(12): 2108-20.
- 26 Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011; 55(4/5): 353-63.
- 27 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587): 983-5.
- 28 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935): 1306-9.
- 29 Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380(6573): 435-9.
- 30 Miquero L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 2000; 127(18): 3941-6.
- 31 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376(6535): 62-6.
- 32 Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(7): a006502.
- 33 Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett* 2013; 328(1): 18-26.
- 34 Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87(7): 1161-9.
- 35 Eklund L, Saharinen P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Exp Cell Res* 2013; 319(9): 1271-80.
- 36 Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; 277(5322): 55-60.
- 37 Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, *et al.* Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest* 2012; 122(6): 1991-2005.
- 38 Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. The Notch signalling system: Recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 2012; 13(9): 654-66.
- 39 Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh Migr* 2007; 1(2): 104-6.
- 40 Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, *et al.* Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 2000; 14(11): 1343-52.
- 41 Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(10):

- 5643-8.
- 42 Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, *et al.* Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 1999; 8(5): 723-30.
- 43 Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, *et al.* Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(45): 15949-54.
- 44 Moccia M, Mosca L, Erro R, Cervasio M, Allocca R, Vitale C, *et al.* Hypomorphic NOTCH3 mutation in an Italian family with CADASIL features. *Neurobiol Aging* 2015; 36(1): 547 e5-11.
- 45 Turnpenny PD, Ellard S. Alagille syndrome: Pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(3): 251-7.
- 46 Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: A balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13(7): 301-7.
- 47 Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, *et al.* Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(6): 2626-31.
- 48 Larsson J, Goumans MJ, Sjostrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Leveen P, *et al.* Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J* 2001; 20(7): 1663-73.
- 49 Klein R. Eph/ephrin signalling during development. *Development* 2012; 139(22): 4105-9.
- 50 Adams RH, Klein R. Eph receptors and ephrin ligands: Essential mediators of vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10(5): 183-8.
- 51 Cowan CA, Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 2001; 413(6852): 174-9.
- 52 Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; 93(5): 741-53.
- 53 Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* 2001; 23(6): 494-507.
- 54 Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal* 2013; 11: 97.
- 55 Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994; 8(16): 1875-87.
- 56 Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999; 126(14): 3047-55.
- 57 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.