

富马酸二甲酯对斑马鱼胚胎早期发育的影响

王雪 彭维兵 王希敏 刘可春* 陈锡强 张云

山东省科学院生物研究所 济南 250014

摘要: 为研究富马酸二甲酯对斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎早期发育的影响, 选取不同发育阶段的斑马鱼胚胎, 用富马酸二甲酯进行染毒处理, 观察胚胎形态发育的异常, 计算其对不同发育时期胚胎的 24 h、48 h 半数致死浓度 (LC_{50}) 和胚胎 72 h 孵化率, 并考察富马酸二甲酯对胚胎血管发育的影响。结果表明, 富马酸二甲酯影响斑马鱼胚胎的早期发育, 呈剂量依赖性特点, 并与开始处理的时间点有关。富马酸二甲酯引起 2 hpf (受精后 2 h, 2 hours post-fertilization)、10 hpf、24 hpf 斑马鱼胚胎死亡的 24 h LC_{50} 值分别为: 13.33 $\mu\text{mol/L}$ 、17.98 $\mu\text{mol/L}$ 、32.50 $\mu\text{mol/L}$, 48 h LC_{50} 值分别为: 13.31 $\mu\text{mol/L}$ 、16.35 $\mu\text{mol/L}$ 、22.50 $\mu\text{mol/L}$; 长期低浓度富马酸二甲酯 ($\geq 6 \mu\text{mol/L}$) 作用引起胚胎 72 h 孵化率下降。27.5 $\mu\text{mol/L}$ 富马酸二甲酯作用后会显著降低胚胎血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 的表达水平。

关键词: 斑马鱼; 富马酸二甲酯; 胚胎; 早期发育

中图分类号: Q942 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2013)04-574-07

Toxic Effect of Dimethyl Fumarate on Early Development of Zebrafish Embryos

WANG Xue PENG Wei-Bing WANG Xi-Min LIU Ke-Chun* CHEN Xi-Qiang ZHANG Yun

Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

Abstract: To study the effect of dimethyl fumarate on early development of Zebrafish (*Danio rerio*), embryos at different developmental stages were treated with various concentrations of dimethyl fumarate. Morphological abnormalities were observed and Median lethal concentration at 24 h (24 h LC_{50}), 48 h LC_{50} and 72 h hatching rate were calculated. Effect on the blood vessel development was studied as well. The results indicated that dimethyl fumarate affected early embryo development in a dose-dependent manner and this adverse effect was related with the embryonic stage. The 24 h LC_{50} of dimethyl fumarate for 2 hpf (hours post-fertilization), 10 hpf and 24 hpf embryos were 13.33 $\mu\text{mol/L}$, 17.98 $\mu\text{mol/L}$ and 32.50 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and 48 h LC_{50} were 13.31 $\mu\text{mol/L}$, 16.35 $\mu\text{mol/L}$ and 22.50 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Embryo hatching rate at 72 h decreased after long term treatment with low concentrations of dimethyl fumarate. Dimethyl fumarate at concentration of 27.5 $\mu\text{mol/L}$ significantly reduced the expression level of vascular endothelial growth factor 2.

Key words: Zebrafish (*Danio rerio*); Dimethyl fumarate; Embryos; Early development

富马酸二甲酯 (dimethyl fumarate, DMF), 又名延胡索酸二甲酯, 是一种具有高抗菌活性的化合物, 对微生物具有广谱、高效的抑菌杀菌作用。动物实验表明 DMF 属低毒物质, 无致畸、致癌作用, 人畜代谢后无残留 (秦钰慧等 1989, 魏庆仪等 1990)。自发现其活性以来,

DMF 被广泛用于各种日常消费品的防霉、防

基金项目 山东省自然科学基金项目 (No. SY2008C178);

* 通讯作者, E-mail: hliukch@sdas.org;

第一作者介绍 王雪, 女, 硕士; 研究方向: 斑马鱼药物活性筛选; E-mail: wangxue8809@163.com。

收稿日期: 2012-12-18, 修回日期: 2013-03-15

腐、防虫,并一度作为添加剂用于食品和饲料。近几年欧洲多个国家相继发生因接触 DMF 处理过的商品引起消费者皮肤炎症的事件 (Lefranc et al. 2011),DMF 应用带来的安全性问题不断暴露。研究表明,DMF 易被皮肤吸收,接触低剂量的 DMF 会引起皮肤过敏和刺激症状 (Lefranc et al. 2011),在某些情况下甚至会引起急性呼吸系统疾病,2009 年欧盟委员会通过了禁止含有 DMF 的消费品进入欧洲市场的指令。国内也已将 DMF 从食品和饲料添加剂目录中删除,并禁止产品或包装内使用含有 DMF 的干燥剂或防霉剂。

在国外,DMF 作为一种口服药物用于银屑病等皮肤病的治疗已有 50 多年的历史,能有效缓解炎症反应程度,缩小皮肤损伤面积,长期应用安全性高 (Brewer et al. 2007)。研究发现,它能下调多种促炎性细胞因子的表达水平 (Rostami-Yazdi et al. 2009),如 E-选择素、钙黏蛋白,具有免疫调节和神经保护作用,能诱导 T 细胞的凋亡 (Zhu et al. 2001),并通过抑制金属蛋白酶活性而降低黑色素瘤细胞的浸润和转移 (Valero et al. 2010, Yamazoe et al. 2009);能强化肿瘤放疗和药物化疗的疗效 (Boivin et al. 2011)。与肿瘤类似,临床多种慢性炎症性疾病,如银屑病、糖尿病、风湿性关节炎等均伴有血管数量增加,新生血管的生成有助于维持或增加组织血供,与疾病发展及预后密切相关 (Meissner et al. 2011)。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种重要的血管生成调控因子,通过与几种高亲和受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 结合,对血管生成、血管结构完整及功能维持具有重要作用。其中 VEGFR2 特异性表达于血管内皮细胞或其前体细胞,对血管生成尤为重要。体外实验发现 DMF 能降低人脐静脉内皮细胞 VEGFR2 表达,导致内皮细胞无法形成管样结构 (Meissner et al. 2011),具有抑制血管生成作用。DMF 在临床抗炎、抗肿瘤治疗方面具有良好的应用前景。

目前国内已报道的 DMF 毒性方面的研究

多应用啮齿动物模型,对 DMF 应用安全性方面的研究资料尚不全面 (刘晓庚 2010),DMF 在不同动物体内的代谢机理和具体活性代谢物需要进一步明确。斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为一种理想的脊椎模式动物,广泛用于化合物毒性、药物研发及人类疾病研究,在毒性研究方面胚胎比成鱼具有更高的灵敏性,一些国家已用斑马鱼胚胎替代传统的成鱼进行急性毒性实验。本文以斑马鱼胚胎为动物模型,研究了 DMF 对斑马鱼胚胎早期发育的影响,为进一步用斑马鱼胚胎进行 DMF 抗炎、抗肿瘤和体内代谢动力学研究提供基础实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验所用 AB 系野生斑马鱼 (wild type, AB strain) 和 Tg(*vegfr2*:GFP) 转基因斑马鱼,于本实验室参照 Westerfield (1995) 方法养殖。在正常 Tg(*vegfr2*:GFP) 斑马鱼体内,绿色荧光蛋白特异性表达于胚胎和成鱼的血管内皮细胞及其前体细胞。挑选 6~12 月龄的健康斑马鱼成鱼用于产卵,预先分别将 2 种斑马鱼雌雄亲鱼按 ♀:♂ 比例 2:1 配对,连续产卵 2 次以上。收集受精卵,用培养水 (5 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L CaCl₂, 0.16 mmol/L MgSO₄) 小心冲洗 2 遍后,移入足量的新鲜培养水中,放于 28.5℃ 控温光照培养箱内,继续发育至所需时间。

1.1.2 试剂 富马酸二甲酯 (上海晶纯试剂有限公司,批号 23588),分子量为 144.13,纯度 ≥99.9%,以二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 助溶,实验时根据需要上述培养水稀释至不同浓度,DMSO 终体积分数最高不超过 0.2%;链霉菌蛋白酶 (pronase, Roche 公司);VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂 PTK787 (Vatalanib) (Sigma 公司);所用试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器 体视显微镜 (COIC-ZSA302,重庆光电仪器有限公司),荧光显微镜 (COIC XSZ-H,重庆光电仪器有限公司),倒置显微镜 (TH4-

200, OLYMPUS), 控温光照培养箱 (SPX-300B-G 型, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性实验 选取发育 2 hpf、10 hpf 和 24 hpf 的 AB 斑马鱼胚胎, 采用静水式毒性实验方法进行。根据预实验确定 2 hpf (受精后 2 h, hours post-fertilization) 胚胎所添加 DMF 的终浓度为 12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5 $\mu\text{mol/L}$; 10 hpf 胚胎所添加 DMF 的终浓度为 12、14、16、18、20、22 $\mu\text{mol/L}$; 24 hpf 胚胎所添加 DMF 的终浓度为 15、20、25、30、35、40 $\mu\text{mol/L}$ 。将待测样品溶液加入到 6 孔培养板中, 每孔为一个 DMF 浓度组。对照组样孔加入含 DMSO 的培养水 (DMSO 含量与最高浓度样品组一致)。体视显微镜下挑选发育正常的胚胎, 随机移入孔内, 每孔 20 枚, 每浓度组设 3 个平行, 加盖封闭后置于控温光照培养箱内, 分别于染毒后 24 h、48 h 计数死亡胚胎数。胚胎凝结、体节未形成、尾部未分离、48 hpf 无心跳均判定胚胎死亡。

1.2.2 DMF 对斑马鱼胚胎早期发育的影响 选取发育 2 hpf 之内的 AB 斑马鱼胚胎, 用 6 孔培养板进行实验。设 DMF 终浓度为 4、6、8、10、12 $\mu\text{mol/L}$, 每孔一个浓度组, 每组 20 枚胚胎, 对照孔加入含 DMSO 的培养水 (DMSO 含量与最高浓度组一致), 每组设 3 个平行孔, 染毒后每 24 h 观察胚胎的发育情况, 弃去死亡胚胎, 更换新样品溶液, 直至 96 hpf, 计算各浓度组胚胎的 72 h 孵化率, 72 h 孵化率 (%) = (每组孵出胚胎数/每组总胚胎数) $\times 100\%$ 。

1.2.3 DMF 对斑马鱼胚胎 VEGFR2 表达的影响 设置终浓度为 15.0、17.5、20.0、22.5、25.0、27.5、30.0 $\mu\text{mol/L}$ 7 个 DMF 处理组, 阳性对照组及空白对照组。将 24 hpf Tg (*vegfr2*: GFP) 斑马鱼胚胎置于 1 g/L 链霉菌蛋白酶溶液中 2~5 min, 去除外膜, 再用培养水清洗 2~3 遍以除去残留蛋白酶, 随机移入 6 孔培养板, 每孔放 20 枚胚胎, 每孔一个浓度, 每个浓度设 3 个平行, 处理 24 h 后于荧光显微镜下观察胚胎体节间血管 (intersegmental vessels, ISV) 绿色荧光蛋

白表达情况, 在统一参数 (曝光值、灵敏度、光圈大小、放大倍数) 下拍照采集荧光图像, 并用 Image-Pro Plus 5.1 图像处理软件测量胚胎体节间血管绿色荧光累积光密度 (integrated optical density, IOD) 值, 作为比较 VEGFR2 蛋白表达量的依据。PTK787 是 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂, 强效抑制 VEGFR2, 具有抑制血管生成和抗肿瘤活性 (Dreves et al. 2002)。设 PTK787 (1 mg/L) 处理组为阳性对照组。空白对照组为含 DMSO 的培养水 (DMSO 含量与最高浓度样品组一致)。

1.2.4 数据统计 采用软件 SPSS 11.0 对数据进行描述分析, 利用软件中的 Probit 模块 (概率单位回归) 计算急性毒性实验中不同发育阶段胚胎的 24 h 和 48 h 半数致死浓度 (LC_{50})。各组均值的比较采用方差分析, 72 h 孵化率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DMF 对不同发育阶段斑马鱼胚胎的急性毒性 不同发育时期开始染毒的各组斑马鱼胚胎 24 h 和 48 h LC_{50} 见表 1。

表 1 DMF 对 2 hpf、10 hpf 和 24 hpf 斑马鱼胚胎的半数致死浓度 ($\mu\text{mol/L}$)

Table 1 LC_{50} of DMF for 2 hpf, 10 hpf, and 24 hpf Zebrafish embryos

胚胎发育 时期 (hpf) Embryonic stage	半数致死浓度 LC_{50} (95% 可信限)	
	Median lethal concentration LC_{50} (95% confidence limit)	
	24 h	48 h
2	13.33 (13.01 ~ 13.69)	13.31 (13.02 ~ 13.66)
10	17.98 (16.83 ~ 19.26)	16.35 (15.18 ~ 17.50)
24	32.50 (29.46 ~ 35.54)	22.50 (20.28 ~ 24.74)

2 hpf 斑马鱼胚胎经不同浓度 DMF 染毒处理, 12 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组胚胎发育与对照组无明显差异, 浓度升高到 13.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 24 h 后胚胎不能形成正常体节, 出现尾部不延伸和卵黄囊不吸收等发育停滞表现, 48 h 时无心跳, 最终胚胎死亡。10 hpf 胚胎经低浓度 DMF 作用后胚胎发育与对照组无明显差异, 14 $\mu\text{mol/L}$ DMF 作用 24 h 后胚胎出现心包水肿、卵黄囊水肿和

主干血流缺失等循环障碍表现,16 $\mu\text{mol/L}$ 组胚胎循环异常发生率达 100%,作用 48 h 后,循环障碍得更加严重(图 1)。24 hpf 胚胎在染毒 24 h 和 48 h 后,部分组胚胎出现死亡,死亡率呈时间和剂量依赖性,镜下观察各处理组存活胚胎发育情况,与对照组比较未见明显形态异常。

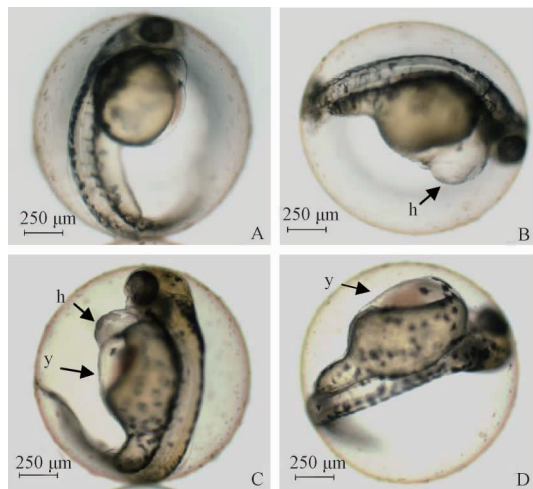


图 1 DMF 对斑马鱼胚胎发育的影响

Fig. 1 Effect of dimethyl fumarate on the development of Zebrafish embryos

A. 对照组; B ~ D: 10 hpf 斑马鱼胚胎经 DMF ($\geq 14 \mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 后引起胚胎卵黄囊水肿和心包水肿。

A. Control; B ~ D. Pericardial edema and yolk sac edema caused by dimethyl fumarate ($\geq 14 \mu\text{mol/L}$).

h. 心包水肿; y. 卵黄囊水肿。

h. Pericardial edema; y. Yolk sac edema.

2.2 DMF 对斑马鱼胚胎早期发育的影响 正常斑马鱼胚胎在 24 hpf 时眼点发育,形成正常体节,躯干活动有力,尾部从卵黄囊上分离并延伸。此时主干血管已形成,镜下可见到主干血流(Liao et al. 1997)。48 h 时卵黄囊进一步吸收缩小,心跳明显而有节奏,并形成完整的体节间血液循环,部分胚胎已开始孵化出膜。本实验在发育 2 hpf 之内将胚胎移入不同浓度 DMF 溶液内连续处理,至 48 h,镜下观察,各浓度组胚胎发育形态未见明显异常;处理至 72 h,6 ~ 12 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组部分胚胎出现心包水肿(图 2),10 $\mu\text{mol/L}$ 组心包水肿发生率 100%,此时对照组胚胎已全部孵化出卵膜,DMF 处理组部

分胚胎不能正常孵化,12 $\mu\text{mol/L}$ 组胚胎全部未孵化,各组胚胎 72 h 孵化率见图 3。观察至 96 h,未见胚胎有其他器官形态异常。

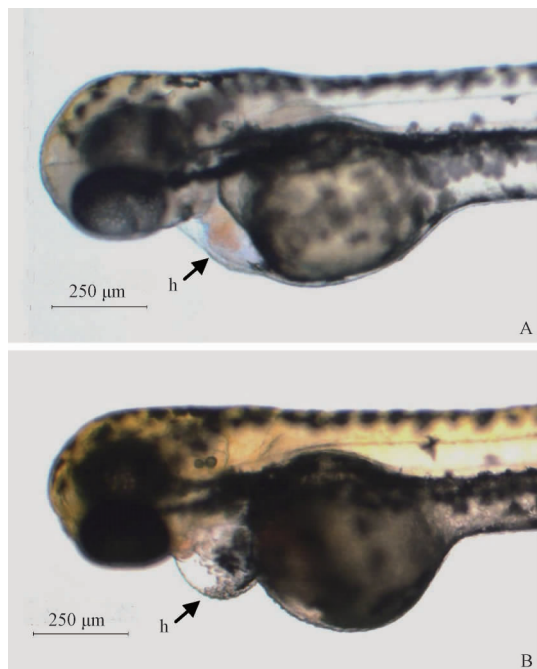


图 2 DMF 对斑马鱼胚胎发育的影响

Fig. 2 Effect of dimethyl fumarate on the development of Zebrafish embryos

A. 对照组; B. 2 hpf 内的胚胎经 12 $\mu\text{mol/L}$ DMF 处理至 72 h。h. 心。

A. Control; B. Embryo (< 2 hpf) after 12 $\mu\text{mol/L}$ dimethyl fumarate treatment for 72 h. H. Heart.

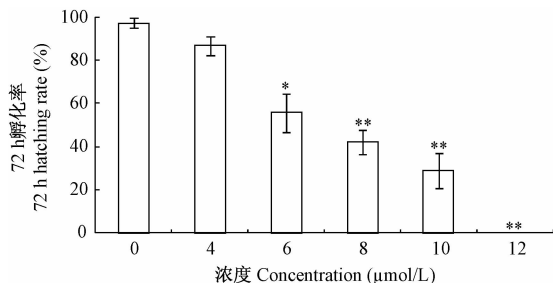


图 3 DMF 对斑马鱼胚胎 72 h 孵化率的影响

Fig. 3 Effect of dimethyl fumarate on 72 h hatching rate of Zebrafish embryos

与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Comparing to the control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 DMF 对斑马鱼胚胎血管 VEGFR2 表达的影响 用不同浓度的 DMF 处理 24 hpf 血管

荧光转基因斑马鱼 Tg(*vegrf2*:GFP) 胚胎, 24 h 后, 镜下观察胚胎体节间血管绿色荧光蛋白表达情况, 发现对照组胚胎体节间血管绿色荧光蛋白表达清晰明亮, 25.0 和 27.5 $\mu\text{mol/L}$ DMF 处理组胚胎体节间血管绿色荧光蛋白表达紊乱、不完整甚至缺失 (图 4), 并伴有胚胎体形细长、色素形成减少等表现, 用 IPP 软件

测量体节间血管绿色荧光累积光密度 (IOD) 值, 27.5 $\mu\text{mol/L}$ 组胚胎体节间血管荧光 IOD 值为 $6\ 167.63 \pm 2\ 636.50$ ($n = 39$), 低于对照组的 $12\ 385.06 \pm 2\ 972.00$ ($n = 52$), 并有极显著差异 ($P < 0.01$) (图 5)。PTK787 (1 mg/L) 处理组 IOD 值为 $2\ 064.02 \pm 654.50$ ($n = 32$)。

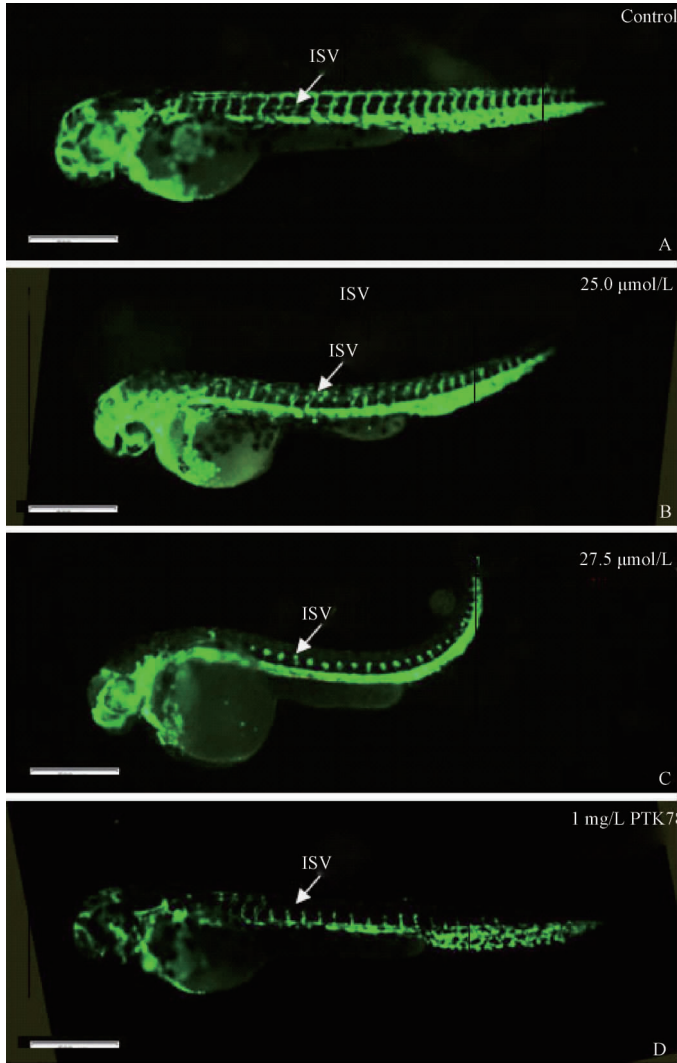


图 4 DMF 对斑马鱼胚胎体节间血管绿色荧光蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of dimethyl fumarate on the fluorescent expression in intersegmental vessels of Zebrafish embryos

A. 对照组胚胎 (48 hpf); B. 25.0 $\mu\text{mol/L}$ DMF 处理组胚胎; C. 27.5 $\mu\text{mol/L}$ DMF 处理组胚胎; D. 1 mg/L PTK787 处理组胚胎。标尺 = 500 μm 。ISV. 体节间血管。

A. Control (48 hpf); B. Embryos after treatment with 25.0 $\mu\text{mol/L}$ dimethyl fumarate; C. Embryos after treatment with 27.5 $\mu\text{mol/L}$ dimethyl fumarate; D. Embryos after treatment with 1 mg/L PTK787. Bar = 500 μm . ISV. Intersegmental vessels.

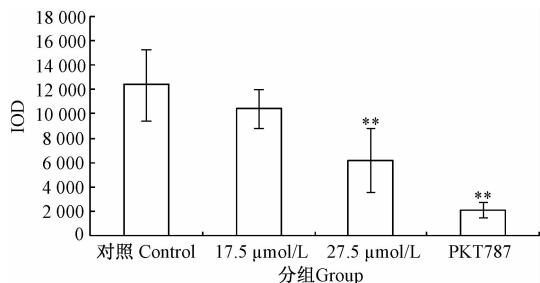


图5 DMF对斑马鱼胚胎(24 hpf)体节间血管荧光累积光密度(IOD)的影响

Fig.5 Effect of dimethyl fumarate on the integrated fluorescent density in the intersegmental vessels of 24 hpf Zebrafish embryos

与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Comparing to the control, ** $P < 0.01$.

3 讨论

DMF是一种应用历史较久、疗效显著的银屑病治疗药物,临床应用中发现,长期服用DMF药物的病人较少发生肿瘤,尤其是肾细胞肿瘤(Arbiser 2011)。这提示我们DMF在临床肿瘤治疗方面具有潜在的重要研究与应用价值。但是,目前DMF在体内的代谢途径及具体的活性代谢物尚不明确(Arbiser 2011),口服后DMF如何通过消化道内壁,耐受住血液中酯酶类的降解作用到达皮肤的炎症病灶,还没有明确答案。有研究认为,DMF口服后有相当一部分没有水解,进入血液循环后与谷胱甘肽(glutathione, GSH)发生作用,其代谢与GSH相关(Rostami-Yazdi et al. 2009)。

本文以斑马鱼胚胎为模型研究DMF对胚胎早期发育的影响及作用规律。由数据看,在不同发育阶段接触DMF会导致胚胎出现不同形式的发育异常,胚胎发育时间越早,对DMF的敏感性越高,越容易导致死亡(表1)。发育早期(<2 hpf)接触DMF,胚胎出现不能形成正常体节、尾部不延伸和卵黄囊吸收不良等整体发育障碍表现;至发育10 hpf左右时接触DMF导致胚胎出现严重心包水肿和卵黄囊水肿,10 hpf时期胚胎血管开始发育,血管生成相关因子活跃表达(Liao et al. 1997),胚胎正处于

循环系统建立的关键期,此时接触DMF易造成循环系统发育异常,这与张立凤等(2006)的研究结果具有一致性,其研究外源性视黄酸对斑马鱼心血管系统发育的影响时,经过比较确定原肠胚晚期(9.5 hpf)为研究视黄酸引起斑马鱼胚胎心脏发育异常的作用时间窗。24 hpf胚胎大部分器官已经基本发育完成,主干血管已建立,此时用DMF处理,未造成胚胎形态明显异常和循环系统障碍,胚胎也不易死亡。发育早期胚胎(<2 hpf)经不同浓度DMF连续处理至72 hpf,6~12 μmol/L组胚胎出现心包水肿,DMF浓度越高,心包水肿发生率越高。DMF对胚胎72 h孵化率有影响,6~12 μmol/L组胚胎72 h孵化率明显降低(图3),12 μmol/L组胚胎全部未孵出,但胚胎孵化率与心包水肿间无明显相关性。处理至96 hpf,所有胚胎未见有其他脏器的异常改变。

新生血管生成是炎症及肿瘤发生过程中的一项重要病理改变,抑制病灶部位血管生成是扼制炎症和肿瘤发展的一个有效方法。本研究以Tg(*vegfr2*:GFP)斑马鱼为模型,通过观察荧光报告基因的表达量来研究整体动物水平上DMF对VEGFR2表达的影响。结果显示,25.0和27.5 μmol/L的DMF作用24 h后,胚胎体节间血管出现绿色荧光蛋白表达紊乱、缺失表现,甚至不能形成完整的体节间血管结构,同时胚胎伴有体形细长、色素形成少等发育不良表现,测量数据显示,27.5 μmol/L DMF处理组胚胎体节间血管绿色荧光的累积光密度(IOD)值显著低于对照组,表明DMF降低了胚胎体节间血管VEGFR2表达水平,具有抑制血管生成的作用,这与García-Caballero等(2011)的研究结果一致。抑制血管生成应该是DMF发挥抗炎、抗肿瘤作用的又一重要机制。

体外实验中,DMF能降低人脐静脉内皮细胞VEGFR2的表达水平,机制是DMF抑制了转录因子Sp1与VEGFR2启动子调控区域的结合,影响了启动子活性(Meissner et al. 2011)。有研究发现DMF对转录因子NF-κB具有抑制作用,参与控制下游多个与血管发生相关基因

的表达,抑制内皮细胞与肿瘤细胞生长(García-Caballero et al. 2011)。这说明 DMF 抑制血管生成活性涉及多个方面,与多种复杂机制有关。以斑马鱼为模式生物,从整体动物水平上进一步开展 DMF 活性及作用机制相关的研究,能更准确地反映在机体内环境和各器官间的相互作用下 DMF 的代谢情况和作用特点,并将为其在临床疾病治疗中的应用提供更丰富和更有价值的参考资料。

参 考 文 献

- Arbiser J L. 2011. Fumarate esters as angiogenesis inhibitors: key to action in psoriasis? *Journal of Investigative Dermatology*, 131(6): 1189 – 1191.
- Boivin A, Hanot M, Malesys C, et al. 2011. Transient alteration of cellular redox buffering before irradiation triggers apoptosis in head and neck carcinoma stem and non-stem cells. *PLoS One*, 6(1): e14558.
- Brewer L, Rogers S. 2007. Fumaric acid esters in the management of severe psoriasis. *Clinical & Experimental Dermatology*, 32(3): 246 – 249.
- Dreys J, Müller-Driver R, Wittig C, et al. 2002. PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer Research*, 62(14): 4015 – 4022.
- García-Caballero M, Marí-Beffa M, Medina M Á, et al. 2011. Dimethylfumarate inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*; a possible role for its antipsoriatic effect? *Journal of Investigative Dermatology*, 131(6): 1347 – 1355.
- Lefranc A, Flesch F, Cochet A, et al. 2011. Epidemiological description of an outbreak of dermatitis related to dimethylfumarate, France, 2008. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 66(4): 217 – 222.
- Liao W, Biggrove B W, Sawyer H, et al. 1997. The zebrafish gene *cloche* acts upstream of a *flk-1* homologue to regulate endothelial cell differentiation. *Development*, 124(2): 381 – 389.
- Meissner M, Doll M, Hrgovic I, et al. 2011. Suppression of VEGFR2 expression in human endothelial cells by dimethylfumarate treatment: evidence for anti-angiogenic action. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(6): 1356 – 1364.
- Rostami-Yazdi M, Clement B, Schmidt T J, et al. 2009. Detection of metabolites of fumaric acid esters in human urine: Implications for their mode of action. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(1): 231 – 234.
- Valero T, Steele S, Neumüller K, et al. 2010. Combination of dacarbazine and dimethylfumarate efficiently reduces melanoma lymph node metastasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(4): 1087 – 1094.
- Westerfield M. 1995. *The Zebrafish Book*. Eugene: University of Oregon Press, 16 – 21.
- Yamazoe Y, Tsubaki M, Matsuoka H, et al. 2009. Dimethylfumarate inhibits tumor cell invasion and metastasis by suppressing the expression and activities of matrix metalloproteinases in melanoma cells. *Cell Biology International*, 33(10): 1087 – 1094.
- Zhu K, Mrowietz U. 2001. Inhibition of dendritic cell differentiation by fumaric acid esters. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(2): 203 – 208.
- 刘晓庚. 2010. 富马酸二甲酯的毒性研究进展. *中国粮油学报*, 25(4): 116 – 120.
- 秦钰慧, 郭润荣, 刘景兰, 等. 1989. 富马酸二甲酯的毒性和致突变性研究. *卫生研究*, 18(3): 24 – 37.
- 魏庆仪, 郭润荣, 宋向东, 等. 1990. 富马酸二甲酯的致畸性研究. *卫生研究*, 19(1): 28 – 31.
- 张立凤, 钟涛, 桂永浩. 2006. 外源性视黄酸对斑马鱼心血管系统发育的影响. *中国实验动物学报*, 14(2): 84 – 88.