

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2008 )03-0264-05

## rmh-TNF 协同顺铂抗小鼠 Lewis 肺癌血管生成的作用

魏素菊\*, 尤江莲, 韩文峰, 刘义冰( 河北医科大学 附属第四医院 肿瘤内科, 石家庄 050011 )

[ 摘 要 ] 目的: 观察重组改构人肿瘤坏死因子( recombinant mutant human tumor necrosis factor, rmh-TNF )协同顺铂( cisplatin, 又称 DDP )抗小鼠 Lewis 肺癌血管生成的作用。方法: 建立 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型, 随机分为 4 个治疗组: 生理盐水对照组、rmh-TNF( 150 万 U/kg )组、DDP( 6.15 mg/kg )组、联合用药组( DDP + rmh-TNF )。接种肿瘤细胞后 12 d 开始瘤内注射药物 3 d, RT-PCR 法测定瘤组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达, 免疫组化法检测肿瘤组织血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF )、激酶结构域受体( kinase domain region receptor, KDR )、微血管密度( microvascular density receptor, MVD )的表达, 流式细胞术测定基质金属蛋白酶 2( matrix metalloproteinase-2, MMP-2 )的表达。结果: 对照组、rmh-TNF 组、DDP 组和联合用药组小鼠肿瘤组织中的 MVD 数分别为( 24.76  $\pm$  1.28 )、( 18.95  $\pm$  1.22 )、( 19.53  $\pm$  1.15 )、( 10.43  $\pm$  1.05 ), 两单药组的 MVD 数明显低于对照组(  $P < 0.05$  ); 联合用药组低于两单药组(  $P < 0.05$  )。HIF-1 $\alpha$  mRNA 相对表达水平分别为( 0.171  $\pm$  0.004 )、( 0.138  $\pm$  0.006 )、( 0.134  $\pm$  0.006 )、( 0.095  $\pm$  0.006 ), 两单药组较对照组明显下降(  $P < 0.05$  ), 联合用药组明显低于两单药组(  $P < 0.05$  )。肿瘤组织中 MMP-2 蛋白的荧光指数 FI 值依次为( 1.000  $\pm$  0.000 )、( 0.875  $\pm$  0.020 )、( 0.848  $\pm$  0.127 )、( 0.545  $\pm$  0.107 ), 单药组的 MMP-2 蛋白的( FI )值较对照组明显下降(  $P < 0.05$  ), 联合用药组明显低于两单药组(  $P < 0.05$  )。单药组 VEGF、KDR 表达均明显低于对照组(  $P < 0.05$  ), 联合用药组的表达均低于各单药组(  $P < 0.05$  )。结论: rmh-TNF 能够增强 DDP 抗小鼠 Lewis 肺癌血管生成的作用。

[ 关键词 ] 重组改构人肿瘤坏死因子; 顺铂; Lewis 肺癌; 抗血管生成; 协同作用

[ 中图分类号 ] R734.2; R730.54

[ 文献标志码 ] A

## Recombinant mutant human tumor necrosis factor enhances anti-angiogenesis effect of cisplatin on Lewis lung carcinoma in mice

WEI Su-ju\*, YOU Jiang-lian, HAN Wen-feng, LIU Yi-bing ( Department of Internal Oncology, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China )

[ Abstract ] **Objective:** To observe the role of rmh-TNF in enhancing the anti-angiogenesis effect of cisplatin on Lewis lung carcinoma in the mice. **Methods:** Lewis lung carcinoma model was established in C57BL/6 mice. Sixty model mice were randomly divided into 4 groups: control group, rmh-TNF group( 1 500 000 U/kg ), cisplatin group( 6.15 mg/kg ), and rmh-TNF plus cisplatin group. Twelve days after implantation of cancer cells, different drugs were injected intratumorally for 3 d. The expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ( HIF-1 $\alpha$  ) gene in the tumor was identified by RT-PCR. Immunohistochemistry ( IHC ) image analysis was performed to determine the vascular endothelial growth factor ( VEGF ) and kinase domain region receptor ( KDR ) expression and the microvessel density( MVD ). Expression of matrix metalloproteinase-2( MMP-2 ) was detected by flow cytometry. **Results:** The MVD values in the control group, the rmh-TNF group, the DDP group and the combination group were( 24.76  $\pm$  1.28 ), ( 18.95  $\pm$  1.22 ), ( 19.53  $\pm$  1.15 ), ( 10.43  $\pm$  1.05 ), respectively, with those of the rmh-TNF and DDP groups significantly lower than that of the control group and higher than that of the combination group ( all  $P < 0.05$  ). The relative levels of HIF-1 $\alpha$  mRNA in the control group, rmh-TNF group, DDP group and the combination group were ( 0.171  $\pm$  0.004 ), ( 0.138  $\pm$  0.006 ), ( 0.134  $\pm$  0.006 ), ( 0.095  $\pm$  0.006 ), respectively, with the levels in the single drug groups significantly lower than that in the control group (  $P < 0.05$  ) and higher than that of the combination group (  $P < 0.05$  ). The relative levels of MMP-2 in the control group, rmh-TNF group, DDP group and combination group were ( 1.000  $\pm$  0.000 ), ( 0.875  $\pm$  0.020 ), ( 0.848  $\pm$  0.127 ), and

[ 基金项目 ] 河北省科技攻关计划( No.072761147 ). Supported by Science and Technology Research Program of Heibei Province ( No.072761147 )

[ 作者简介 ] 魏素菊( 1963- ), 女, 河北省唐山市人, 硕士, 主要从事肿瘤化疗方向的研究

\* Corresponding author. E-mail: weisuju@126.com

( $0.545 \pm 0.107$ ), respectively, with those of the single drug groups significantly lower than that of the control group and higher than that of the combination group ( respectively  $P < 0.05$  ). VEGF, KDR expression levels in the single drug groups were significantly higher than that in the combination group and lower than that in the control group ( $P < 0.05$  ).

**Conclusion:** rmh-TNF can enhance the anti-angiogenesis effect of DDP on Lewis lung cancer in mice and improve their immunological function.

[ **Key words** ] recombinant mutant human tumor necrosis factor; cisplatin; Lewis lung carcinoma; synergism; anti-angiogenesis

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 264-268 ]

天然肿瘤坏死因子(natural tumor necrosis factor, nTNF)是由激活人巨噬细胞产生的一种可溶性细胞因子,能够相对特异地杀伤肿瘤细胞,引起肿瘤坏死。是迄今为止人们所知道的抗肿瘤活性最强的细胞因子。但是由于 TNF 用量大和不良反应强,其在临床的应用受到限制。因此,国内外学者均广泛应用基因或蛋白工程技术,对 nTNF 进行改造,以期降低其毒性反应,增加临床疗效。重组改构人肿瘤坏死因子(recombinant mutant human tumor necrosis factor, rmh-TNF)即属于高活性、低毒性<sup>[1]</sup>的基因工程 TNF。rmh-TNF 与体内诱生的 TNF 具有相同的抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。rmh-TNF 对不同部位的肿瘤有不同的作用效果,对少数肿瘤有促进增殖的作用,对某些肿瘤有抑制增殖的作用(如卵巢肿瘤)<sup>[3]</sup>;与化疗药物联用对消化道、头颈部肿瘤等没有增敏作用。rmh-TNF 能够增敏化疗药物对肺癌的抑制已有报道<sup>[4]</sup>,但目前尚缺少作用机制方面的基础研究资料。本实验对 rmh-TNF 协同化疗药物的抗肺癌血管生成作用作了初步的探讨,通过 C57BL/6 小鼠的体内实验验证了 rmh-TNF 对顺铂(cisplatin, 又称 DDP)抑制 Lewis 肺癌肿瘤血管生成的协同作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物和主要试剂

C57BL/6 小鼠共 60 只,雌性,体质量 18~20 g。实验动物合格证编号:707092,饲养于 SPF 级实验室。

小鼠 Lewis 肺癌细胞株由河北医科大学第四医院科研中心保种和提供。DDP 20 mg/瓶,购自山东齐鲁制药有限公司,生产批号为 5100222DC。rmh-TNF 500 万 U/瓶,购自上海赛达生物药业股份有限公司。RPMI 1640 培养液购自 GIBCO 公司,小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

### 1.2 细胞培养

取小鼠 Lewis 肺癌细胞(LLC)加入含 10% 小牛血清的培养液后,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,常规换液,分瓶,3 d 后收集细胞,用 PBS 液调整细

胞密度至  $1 \times 10^7$  /ml,以备接种。

### 1.3 造模方法<sup>[5]</sup>及动物分组、处理

每只小鼠右腋下皮下接种 0.2 ml( $2 \times 10^6$  个细胞)后,隔日检查皮下肿瘤生长情况。接种第 7 天都能扪及肿瘤,待第 12 天,扪及皮下肿瘤大小约(1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm)时随机分为 4 组:A 组(生理盐水对照组):瘤内注射<sup>[6]</sup>生理盐水 0.2 ml/只,每天 1 次,连续 3 d; B 组(rmh-TNF 单药组):瘤内注射<sup>[6]</sup>150 万 U/kg,每天 1 次,连续 3 d; C 组(DDP 单药组):瘤内注射<sup>[6]</sup>6.15 mg/kg,每天 1 次,连续 3 d; D 组(DDP + rmh-TNF 联合组):瘤内注射<sup>[6]</sup>DDP 6.15 mg/kg 和 rmh-TNF 150 万 U/kg,每天 1 次,连续 3 d。(DDP、rmh-TNF 剂量均按照动物与人体间的剂量换算表换算)末次给药 24 h 后处死全部小鼠,取下肿瘤组织,切成小组织块,分别用液氮、10% 中性甲醛、70% 冷乙醇固定。

### 1.4 RT-PCR 法测定肿瘤组织 HIF-1 $\alpha$ mRNA 的表达

(1) TRIzol 试剂一步法提取各组肿瘤组织总 RNA,并经紫外线分光光度定量。(2)取 2  $\mu$ g RNA 用于逆转录,方法按 Superscript<sup>TM</sup> First-Strand System for RT-PCR(Invitrogen)试剂盒说明并略加改动操作。(3)PCR 引物:HIF-1 $\alpha$  上游引物:5'-TCAAGT-CAGCAACGTGGAAG-3',下游引物:5'-TATCGAG-GCTGTGTCGACTG-3'。GAPDH 上游引物:5'-GC-CAAACGGGTCATCATCTC-3',下游引物:5'-GACA-CATTGGGGGTAGGAAC-3',经 RT-PCR 扩增后 HIF-1 $\alpha$  为 198 bp。GAPDH 的扩增产物为 379 bp。(4)以 GAPDH 为内参,逆转录后行目的基因和 GAPDH cDNA 扩增。分别取逆转录产物 2.5  $\mu$ l 用于 PCR。50  $\mu$ l 体系包括:Taq DNA 聚合酶,dNTPs,上样染料,稳定剂,优化剂,反应缓冲液,逆转录反应产物,上下游引物等。HIF-1 $\alpha$  PCR 扩增条件:94 °C 50 s,55 °C 50 s,72 °C 90 s,30 个循环;GAPDH PCR 扩增条件:94 °C 40 s,50 °C 50 s,72 °C 90 s,30 个循环。(5)取每个标本的扩增产物 6  $\mu$ l 于 1% 的含 GV 核酸染料的琼脂糖凝胶电泳,以 BIO-PROFIF 凝

胶图像分析系统 Bio-1D 分析软件对目的电泳条带进行分析,以相应的内参电泳条带作为参照,结果以两者之积分吸光度的比值表示( HIF/GA )表示。

### 1.5 免疫组化法测定肿瘤组织内 VEGF、KDR、MVD 的表达

免疫组化采用 S-P 法。10% 中性甲醛固定肿瘤组织 4 ~ 10 h 后,梯度乙醇系列脱水,石蜡包埋后,4 μm 连续切片,二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水,3% 过氧化氢甲醇封闭内源性过氧化物酶,按抗体说明书要求进行相应修复。5% 正常山羊血清封闭,分别滴加 VEGF、激酶结构域受体( kinase domain region receptor, KDR )和 CD34 一抗,染色步骤按试剂盒说明进行,DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,中性树脂胶封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知阳性切片作为阳性对照。

VEGF、KDR 阳性表达为肿瘤细胞胞膜或胞质呈棕黄色。每张切片在高倍镜( ×400 )下随机选取 5 个视野计数阳性细胞,并取均值,计算其与同一视野下肿瘤细胞总数均值的比值作为阳性表达率( % )。阳性细胞数 ≥ 10% 定为高表达( ++ ), < 10% 定为低表达( + )。

抗 CD34 单抗免疫组化检测方法见参考文献<sup>[7]</sup>。MVD 测定以 CD34 单抗标记内皮细胞,任何胞质染成棕色的内皮细胞或内皮细胞团,均按独立的微血管分别计数。计数时先在低倍镜下选择微血管密度最高的区域,然后在 200 倍视野下计数 4 个视野中的微血管数目。取平均数为该例的 MVD 值。

### 1.6 流式细胞仪检测肿瘤组织 MMP-2 蛋白的表达

将用 70% 冷乙醇固定的肿瘤组织用生理盐水研磨后制成单细胞悬液,1% PBS( pH 7.0 )溶液固定 30 min,0.5% 牛血清白蛋白封闭 20 min,依次加入 0.1 ml 1:50 稀释的一抗室温 60 min 及 FITC-IgG 室温 30 min。每个样品计数 10 000 个细胞,上机检测,同时设有 PBS 代替一抗和二抗的阴性对照。计算样品的荧光指数( FI ),以 FI 来测定基质金属蛋白 2( matrix metalloproteinase-2, MMP-2 )表达水平。FI = ( 实验组平均荧光强度 - 阴性对照组平均荧光强度 ) / 正常对照组平均荧光强度。实验重复 3 遍。

### 1.7 统计学处理

HIF-1α mRNA、MMP-2、MVD 各组间均数差异性比较采用单因素方差分析和 LSD-t 检验。VEGF、KDR 各组间均数差异性比较采用 χ<sup>2</sup> 检验中 Fisher 精确概率法。P < 0.05 为差异有显著性。所有数据均使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 DDP 和 rmh-TNF 对肿瘤组织 HIF-1α mRNA 表达的影响

以 GAPDH 为内参,对照组、rmh-TNF 单药组和 DDP 组、联合用药组肿瘤细胞 HIF-1α mRNA 相对表达水平分别为( 0.171 ± 0.004 ), ( 0.138 ± 0.006 ), ( 0.134 ± 0.006 ), ( 0.095 ± 0.006 )。单药组的 HIF-1α mRNA 相对表达水平较对照组明显下降( P < 0.05 ),联合用药组的相对表达水平明显低于两单药组( P < 0.05 ),两单药组之间无明显差异。



图 1 DDP 和 rmh-TNF 对肿瘤细胞 HIF-1α mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of DDP and rmh-TNF on expression of HIF-1α mRNA

A<sub>0</sub>, B<sub>0</sub>, C<sub>0</sub> and D<sub>0</sub>: GAPDH in groups; M: Marker; A: Control group; B: rmh-TNF group; C: DDP group; D: rmh-TNF + DDP group

### 2.2 DDP 和 rmh-TNF 对肿瘤组织 VEGF、KDR、MVD 表达的影响

单药组 VEGF、KDR、MVD 表达均明显低于对照组,差异有统计学意义( P < 0.05 );联合用药组 VEGF、KDR、MVD 表达分别低于两个单药组,差异有统计学意义( P < 0.05 ),两单药组之间 VEGF、KDR、MVD 表达无明显差异。(表 1,图 2、3)

联合用药组较对照组及单药组更好的抑制了肿瘤 VEGF、KDR 的表达,使肿瘤组织 MVD 明显下降,达到了较好的抗血管生成作用。

表 1 各组小鼠肿瘤组织 VEGF、KDR 表达和 MVD 的比较  
Tab. 1 Comparison of the VEGF, KDR and MVD expression between different groups( n = 15 )

Group	VEGF		KDR		MVD
	+	++	+	++	
Control	1	14	0	15	24.76 ± 1.28
rmh-TNF	6	9* <sup>Δ</sup>	7	8* <sup>Δ</sup>	18.95 ± 1.22* <sup>Δ</sup>
DDP	7	8* <sup>Δ</sup>	7	8* <sup>Δ</sup>	19.53 ± 1.15* <sup>Δ</sup>
rmh-TNF + DDP	14	1*	14	1*	10.43 ± 1.05*

\* P < 0.05 vs control; <sup>Δ</sup> P < 0.05 vs rmh-TNF + DDP

### 2.3 rmh-TNF 和 DDP 对肿瘤组织 MMP-2 表达的影响

对照组、rmh-TNF 组、DDP 组和联合用药组小鼠肿瘤组织中 MMP-2 蛋白的荧光指数 FI 值依次为 (1.000 ± 0.000)、(0.875 ± 0.020)、(0.848 ± 0.127)、(0.545 ± 0.107)。单药组的 MMP-2 荧光指

数 FI 值较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ ), 联合用药组的荧光指数 FI 值明显低于两单药组 ( $P < 0.05$ ), 两单药组之间无明显差异 (图 4)。结果显示: rmh-TNF 和 DDP 单用均能降低小鼠肿瘤组织 MMP-2 蛋白的表达, 联合用药组对 MMP-2 蛋白的抑制作用较 rmh-TNF 和 DDP 单用的效果明显增强。

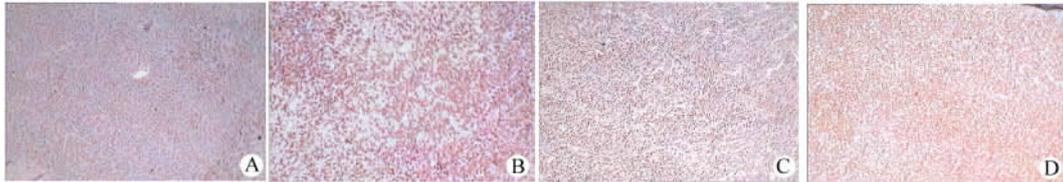


图 2 各组小鼠肿瘤组织中 VEGF 的表达 (S-P, ×200)

Fig. 2 Expression of VEGF in tumors in each group (S-P, ×200)

A: Control group; B: rmh-TNF group; C: DDP group; D: rmh-TNF + DDP group

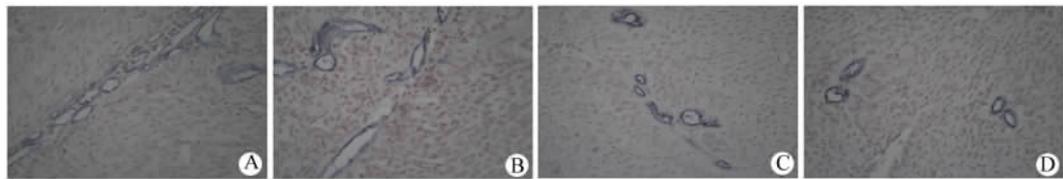


图 3 CD34 抗体免疫组化染色显示移植瘤组织内微血管密度 (S-P, ×400)

Fig. 3 Microvessel density in transplanted tumors detected by CD34 antibody and immunohistochemical staining (S-P, ×400)

A: Control group; B: rmh-TNF group; C: DDP group; D: rmh-TNF + DDP group

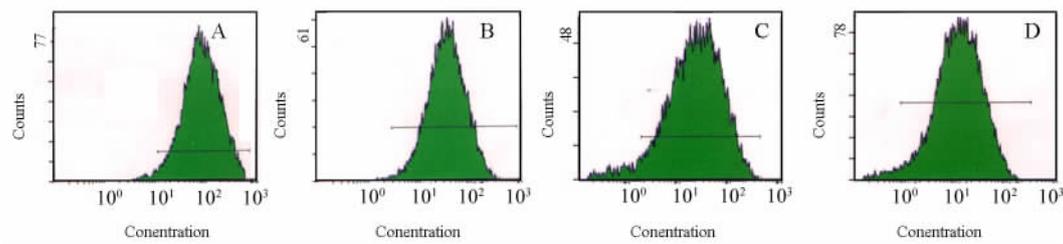


图 4 MMP-2 在各组小鼠 Lewis 肺癌移植瘤组织中的表达

Fig. 4 Expression of MMP-2 in transplanted Lewis lung carcinoma in mice

A: Control group; B: rmh-TNF group; C: DDP group; D: rmh-TNF + DDP group

### 3 讨论

TNF 是由激活的单核巨噬细胞产生的一种可溶性多功能细胞因子, 它的抗肿瘤作用主要通过以下方式实现: (1) 可特异性地直接杀伤肿瘤细胞; (2) 诱导肿瘤细胞凋亡; (3) 逆转肿瘤细胞多药耐药, 增加化疗敏感性; (4) 抗肿瘤血管生成; (5) 增加免疫效应细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。曾有文献报道<sup>[8]</sup>, rmh-TNF 既有不同于化疗药物的作用机制, 又能在杀伤肿瘤细胞的某些环节与化疗药物起到协同及加强作用。本实验采用 DDP 作为化疗药物, 鉴于 rmh-TNF 有别于 DDP 的抗癌机理, 两者合用可能产

生协同作用<sup>[9]</sup>。本实验通过检测 *HIF-1α* mRNA、VEGF、KDR、MVD、MMP-2 在不同处理组的表达水平, 观察 rmh-TNF 对化疗药物的协同增强作用, 并进一步阐明抗肿瘤血管生成可能为其协同化疗药物作用机制之一。

在肿瘤血管生成的研究中发现, 传统的肿瘤治疗方法, 如化疗、放疗、生物治疗和热疗等, 可通过不同的机制对血管生成过程有不同程度的影响。因此采用多种治疗方法联合应用以抑制肿瘤血管生成受到了广泛关注<sup>[10-12]</sup>。

目前较公认的反映肿瘤血管生成程度的指标是肿瘤组织内 MVD 值和肿瘤细胞 VEGF 表达的阳性

率。VEGF 是研究最多的血管内皮生长因子,已证实其在肿瘤血管生成中有重要作用,其表达阳性率与 MVD 值正相关<sup>[13]</sup>。VEGF 被认为可能是目前最强的促血管生成因子,是一高度特异性的血管内皮细胞的有丝分裂素<sup>[14]</sup>,它除了能促进肿瘤新生血管生成外,还能参与肿瘤细胞的生长、分化、转移和增殖等过程。VEGF 需要与细胞表面的血管内皮生长因子受体(VEGFR)结合后通过激活酪氨酸激酶信号转导途径发挥功能。在已发现的 3 个酪氨酸激酶受体中,VEGFR-2(KDR)是血管生成中的主要调节者<sup>[15]</sup>。本实验结果显示:两单药组的 MVD 数较对照组明显降低,而联合用药组较两单药组的 MVD 数降低更为明显,提示 rmh-TNF 和 DDP 单用均有一定的抗肿瘤血管生成作用,而联合用药较单用的抗肿瘤血管生成作用最为显著,从而达到更好的抗肿瘤作用。对照组的肿瘤组织中 VEGF 和 KDR 高表达的小鼠数量明显高于两单药组,而联合用药组明显低于两单药组。实验对小鼠肿瘤组织 VEGF 和 KDR 的检测同样反映了 rmh-TNF 和 DDP 单用均有抗肿瘤血管生成的作用,而联合用药较单用的抗肿瘤血管生成作用更加显著,从而达到更好的抗肿瘤作用。

HIF 是 VEGF 的上游基因,是近年发现的一种转录因子,由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚单位组成,其中 HIF-1 $\alpha$  是决定 HIF-1 活性的缺氧调控亚基<sup>[16]</sup>,组织处于缺氧状态时它发挥转录和基因调控作用<sup>[17-18]</sup>。MMP-2 对肿瘤的生长、血管生成、浸润和转移均有重要意义。由于与肺癌的血管生成和转移密切相关,MMP-2 常用于抗肿瘤血管生成治疗的研究。本实验通过对 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和 MMP-2 蛋白的检测,结果同样显示:rmh-TNF 和 DDP 单用均能降低小鼠肿瘤组织 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和 MMP-2 蛋白的表达,从而抑制肿瘤血管生成,达到抗肿瘤的作用。但联合组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和 MMP-2 蛋白的表达明显低于两单药组,联合用药组对 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和 MMP-2 蛋白的抑制作用较 rmh-TNF 和 DDP 单药的效果明显增强。

本实验通过对上述 5 个反映肿瘤血管生成指标的检测,表明单独应用 rmh-TNF 和 DDP 均有一定的抗肿瘤血管生成的特性,但联合应用有明显的协同增强效应,rmh-TNF 能够协同顺铂对小鼠 Lewis 肺癌抗血管生成的作用。鉴于此实验仍为动物实验,有待于进行大样本的临床实验进一步验证。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Yan Z, Zhao N, Wang Z, *et al.* A mutated human tumor necrosis factor-alpha improves the therapeutic index *in vitro* and *in vivo*

[ J ]. *Cytotherapy*, 2006, 8( 4 ): 415-423.

- [ 2 ] 杨亚菁,袁志军,罗以,等. 重组改构人肿瘤坏死因子治疗 47 例恶性胸腹腔积液[ J ]. 中国癌症杂志, 2004, 14( 4 ): 396-398.
- [ 3 ] 魏素菊,刘海英,史健,等. 重组改构人 TNF 逆转卵巢癌耐药细胞株 SKOV3/DDP 的耐药性及其机制[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15( 2 ):150-154.
- [ 4 ] 金阳,熊先智,陶晓南,等. 重组改构人肿瘤坏死因子对小细胞肺癌化疗的干预[ J ]. 中国医院药学杂志, 2006, 26( 3 ): 270-272.
- [ 5 ] 丘萌,易成,侯梅. 联合低剂量化疗对小鼠 Lewis 肺癌抗血管生成和抗肿瘤作用的研究[ J ]. 四川大学学报: 医学版, 2006, 37( 4 ): 534-537.
- [ 6 ] 张春霞,刘基巍. TNF 联合化疗治疗伴恶性胸水的肿瘤临床观察[ J ]. 药物流行病学杂志, 2006, 15( 1 ): 10-11.
- [ 7 ] Gunningham SP, Currie MJ, Han C, *et al.* Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia[ J ]. *Cancer Res*, 2001, 61( 7 ):3206-3211.
- [ 8 ] 唐娟娟,胡燕清,陆琰君. rmh-TNF- $\alpha$  在肺癌细胞 A549 中的作用[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13( 4 ): 276.
- [ 9 ] 王志军,徐红斌,王远惠,等. rmh-TNF 联合顺铂与单用顺铂胸腔注射治疗恶性胸腔积液的比较[ J ]. 现代肿瘤医学, 2007, 15( 2 ): 202-203.
- [ 10 ] Siemann DW, Shi W. Targeting the tumor blood vessel network to enhance the efficacy of radiation therapy[ J ]. *Semin Radiat Oncol*, 2003, 13( 1 ): 53-61.
- [ 11 ] Marx J. Angiogenesis. A boost for tumor starvation[ J ]. *Science*, 2003, 301( 5632 ): 452-454.
- [ 12 ] Siemann DW, Warrington KH, Horsman MR. Targeting tumor blood vessels: an adjuvant strategy for radiation therapy[ J ]. *Radiother Oncol*, 2000, 57( 1 ):5-12.
- [ 13 ] Schmitt O, Schubert C, Feyerabend T, *et al.* Preferential topography of proteins regulating vascularization and apoptosis in a MX1 xenotransplant after treatment with hypoxia, hyperthermia, ifosfamide, and irradiation[ J ]. *Am J Clin Oncol*, 2002, 25( 4 ): 325-336.
- [ 14 ] Wong C, Wellman TL, Lounsbury KM. VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression are increased in advanced stages of epithelial ovarian cancer[ J ]. *Gynecol Oncol*, 2003, 91( 3 ): 513-517.
- [ 15 ] Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications[ J ]. *Blood*, 2005, 105( 4 ):1383-1395.
- [ 16 ] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92( 12 ): 5510-5514.
- [ 17 ] Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension[ J ]. *Am J Physiol*, 1996, 271( 4 pt 1 ):C1172-C1180.
- [ 18 ] Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[ J ]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 551-578.

[ 收稿日期 ] 2008 - 02 - 28

[ 修回日期 ] 2008 - 04 - 25

[ 本文编辑 ] 郁晓路