

重组人血管内皮抑素联合化疗治疗乳腺癌的实验研究

张玮, 潘月龙* (浙江省杭州市第一人民医院肿瘤化疗科, 杭州 310006)

摘要: 目的 研究重组人血管内皮抑素联合化疗方案对人乳腺癌裸鼠移植瘤模型的治疗效应, 并进一步探讨其抑制肿瘤血管生成的作用机制。方法 将乳腺癌荷瘤裸鼠 40 只随机分为 4 组, 分别为化疗组、内皮抑素组、联合用药组及对照组。化疗组给予长春瑞滨和顺铂; 内皮抑素组给予重组人血管内皮抑素; 联合用药组给予长春瑞滨, 顺铂, 和重组人血管内皮抑素; 对照组给予等量的生理盐水。给药期间测量肿瘤大小, 实验结束取肿瘤称重, 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线并比较各组的抑瘤率。免疫组化方法检测各组肿瘤组织微血管密度(MVD), VEGF, HIF-1 α 及 P53 的表达。结果 联合用药组抑瘤率为 64.63%, 化疗组抑瘤率为 35.47%。联合用药组与其他 3 组 MVD 计数比较明显减少, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组及化疗组相比, 联合用药组的 VEGF、HIF-1 α 和 P53 的表达均明显减少, 其差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 重组人血管内皮抑素联合化疗能够有效控制裸鼠乳腺肿瘤生长, 降低肿瘤 MVD, 其机制可能为下调 VEGF 及 HIF-1 α 的表达。内皮抑素对 P53 的作用机制有待于更进一步的研究。

关键词: 乳腺癌; 重组人内皮抑素; 化疗; 血管内皮生长因子; HIF-1 α ; P53

中图分类号: R969.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)12-1085-06

Recombinant Human Endostatin Combined with Vinorelbine-cisplatin Chemotherapy in Treatment of Human Breast Cancer Xenograft in Nude Mice

ZHANG Wei, PAN Yuelong* (Department of Oncology, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the anti-angiogenesis and tumor inhibitory effects of recombinant human endostatin(rhES) combined with vinorelbine-cisplatin chemotherapy(NP regimen) on xenograft tumors in nude mice of human breast carcinoma cell MDA-MB-435S. **METHODS** Forty xenograft nude mice were randomized into 4 groups: NP group (vinorelbine and cisplatin), rhES group (rhES), rhES+NP group(combined treatment as above-mentioned), and control group (normal saline). Inhibitory rate of xenograft and tumor growth curve was calculated and plotted. MVD, VEGF, HIF-1 α and P53 were measured by immunohistochemistry. **RESULTS** Tumor inhibition rate of the rhES+NP group was 64.63%, but that of the NP group was 35.47%. Compared with the other 3 groups, MVD of the rhES+NP group significantly reduced, the difference was statistically significant ($P<0.05$). HIF-1 α , VEGF and P53 of the rhES+NP group was significantly lower than of the control group and the NP group, the difference was statistically significant($P<0.05$). **CONCLUSION** Experiments show that rhES combined with NP regimen can effectively control the tumor growth and decrease tumor MVD in nude mice, which may down-regulated the expression of VEGF and HIF-1 α . The mechanism of rhES on P53 needs further study.

KEY WORDS: breast cancer; recombinant human endostatin; chemotherapy; VEGF; HIF-1 α ; P53

20 世纪 70 年代, Folkman 教授提出了关于肿瘤生长依赖血管发生的假设, 早期肿瘤生长不依赖血管供应, 但当瘤块直径 $>1\sim 2$ mm 时, 即可分泌肿瘤血管发生因子, 引起血管内皮细胞增殖、迁移, 在瘤块内形成新生血管, 使肿瘤继续生长和转移。抑制新生血管、切断其营养供应和转移途径是肿瘤领域的研究热点。在多种抑制剂中, 血管内皮抑素作用较强, 其中重组人血管内皮抑素(rhES)在肺癌中已取得了较好疗效^[1], 而其对乳腺癌的作用并不明了, 其抗血管生成的机理亦不甚明确。乳腺癌是女性常见恶性肿瘤, 近年来发病率逐年递增, 生物治疗成为继放化疗、内分泌治

疗后的另一种值得期待的保守治疗方法, 作为血管依赖的实体肿瘤, 乳腺癌的血管生成在其生长及侵袭中有重要作用, 并与其预后有关^[2]。本实验采用 rhES 联合长春瑞滨(NVB)+顺铂(DDP)即 NP 方案化疗对人乳腺癌(MDA-MB-435S)裸鼠模型进行研究, 以探讨其对裸鼠乳腺肿瘤生长及血管生成的影响, 进一步探讨重组 rhES 抗血管生成的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

rhES(商品名: 恩度)(批号 20090905)由江苏先声药业提供; 长春瑞滨(江苏豪森药业, 批号 090211); 顺铂(批号 090515)为江苏豪森药业生产,

作者简介: 张玮, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)87065701-41081
博士, 主任医师 Tel: (0571)86826181 E-mail: ylong215@sina.com

E-mail: zhangwei329@hotmail.com *通信作者: 潘月龙, 男,

购于杭州市第一人民医院药房。EnVision 试剂盒购自基因科技(上海)有限公司。兔抗 P53 多克隆抗体(编号: SC-6243), 小鼠抗 VEGF 单克隆抗体(编号: SC-7269)均购自圣克鲁斯生物技术公司。小鼠抗 HIF-1 α 单克隆抗体(编号: Ab8366), 兔抗 vWF 多克隆抗体(编号: Ab6994)均购自 Abcam 公司。

1.2 细胞株

人乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞株(中国科学院细胞库上海细胞研究所)。细胞培养条件: 生长于含 10%胎牛血清、青霉素 100 U \cdot mL⁻¹、链霉素 10 U \cdot mL⁻¹、胰岛素 0.2 U \cdot mL⁻¹ 的 RPMI 1640 培养基, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱培养。细胞呈贴壁生长, 每日换液, 2~3 d 传代 1 次。

1.3 动物模型的建立

4~6 周龄裸鼠 42 只, ♀, 体质量 18~25 g, 购于浙江大学医学院实验动物中心, 饲养于浙江大学医学院实验动物中心 SPF 级层流室。取对数生长的 MDA-MB-435S 细胞, 用 0.25%胰酶消化, 用含血清的培养基终止消化, 弯头吸管吹打成细胞悬液, 800 r \cdot min⁻¹, 离心 5 min, PBS 稀释, 制成细胞悬液, 细胞数为 1 \times 10⁷ \cdot mL⁻¹, 于裸鼠右侧第二对乳垫下注射 0.2 mL, 注射后 2~14 d 可见到肿瘤开始生长, 逐渐增大, 未见肿瘤消退, 42 只裸鼠全部成瘤。

1.4 实验分组

人乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞原位接种后 14 d, 42 只裸鼠全部成瘤, 测量肿瘤最大径(a)和最小径(b), 计算肿瘤体积(V): $V=ab^2/2$, 将肿瘤体积过大及过小者排除, 共有 40 只裸鼠进入实验, 按随机数字表法分成 4 个组, 每组 10 只, 各组肿瘤平均体积差异无统计学意义($P>0.05$)。联合用药组(rhES+NP): NVB 1 mg \cdot kg⁻¹, 腹腔注射, 第 1, 8 天, DDP 1 mg \cdot kg⁻¹, 腹腔注射, 第 1, 8 天, rhES 1.5 mg \cdot kg⁻¹, 腹腔注射, 自第 1 天起连续用药 14 d; 化疗组(NP): NVB 1 mg \cdot kg⁻¹, 腹腔注射, 第 1, 8 天, DDP 1 mg \cdot kg⁻¹, 腹腔注射, 第 1, 8 天; rhES 组: rhES 1.5 mg \cdot kg⁻¹, 腹腔注射, 连续 14 d; 对照组: 等量无菌生理盐水, 腹腔注射, 连续 14 d, 进行各项指标检测。

1.5 肿瘤体积及肿瘤生长曲线

每 3 d 用游标卡尺测 1 次肿瘤最大径(a)和最小径(b), 计算肿瘤体积(V): $V=ab^2/2$, 直至第 15 天。取各组平均值, 绘制肿瘤生长曲线; 实验结束,

完整剥离肿瘤, 称质量, 计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(对照组瘤体质量-实验组瘤体质量)/对照组瘤体质量 \times 100%。

1.6 免疫组化检测

第 15 天颈椎脱臼处死裸鼠, 完整将肿瘤剥离, 将剥离的肿瘤组织立即用 10%甲醛固定, 石蜡包埋、5 μ m 切片、免疫组化 EnVision 法染色。

1.6.1 肿瘤微血管密度(MVD) 采用 1:300 稀释的兔抗 vWF 多克隆抗体为一抗, 操作步骤按说明书进行, 切片观察按照 Weidner 法^[3], 即先在 40 倍光镜下选取新生血管最密集区, 然后于 200 倍视野下, 在微血管密度最大的“热点”(hot spot)区域计数染成棕色的血管数目, 以 3~5 个高倍视野微血管计数的均数表示 MVD。

1.6.2 VEGF 的检测 采用 1:50 稀释的小鼠抗 VEGF 单克隆抗体为一抗, 操作步骤按说明书进行。以已知的阴性切片作阴性对照。以已知阳性切片作阳性对照。VEGF 蛋白阳性表达为棕黄色颗粒, 主要存在于细胞质。VEGF 蛋白表达结果评分按 Rahman 等^[4]方法进行, 即: 分值高低等于着色细胞的比例评分(染色范围)+染色的强度评分, 染色范围(阳性细胞比率)分为 0~4 级, 阴性为 0; 阳性细胞 1%~25%为 1; 阳性细胞 26%~50%为 2; 阳性细胞 51%~75%为 3; 阳性染色 76%~100%为 4。染色强度标准划分为 0~3 级: 0 阴性; 1 弱阳性; 2 中等强度; 3 强阳性。

1.6.3 缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor1, alpha subunit, HIF-1 α)的检测 采用 1:50 稀释的小鼠抗 HIF-1 α 单克隆抗体为一抗, 操作步骤按说明书进行。以已知的阴性切片作阴性对照。以已知阳性切片作阳性对照。HIF-1 α 以细胞核或细胞浆出现黄色颗粒为阳性。参照 Birner 等^[5]的方法, 高倍镜下每张切片随机选择 10 个视野, 共计 1000 个细胞, 计算每张切片阳性细胞百分率。阳性细胞率<1%为 0 分, 1%~10%为 1 分, 11%~50%为 2 分, 51%~80%为 3 分, >80%为 4 分。染色强度记分为无色记 0 分, 淡黄色记 1 分, 棕黄色记 2 分, 棕褐色记 3 分。两项分值相加总和(染色总分)为最终结果。

1.6.4 P53 的检测 采用 1:50 稀释的兔抗 P53 多克隆抗体为一抗, 操作步骤按说明书进行。以已知的阴性切片作阴性对照。以已知阳性切片作阳性对照。P53 阳性标准参考许良中等^[6]的方法,

先将特异性出现在细胞核的染色按着色深浅打分(与背景着色相对比): 0分为无色、1分为淡黄色、2分为棕黄色、3分为棕褐色; 再将阳性细胞所占百分比打分: 0分为阴性、1分为 $\leq 10\%$ 、2分为 $11\% \sim 50\%$ 、3分为 $> 51\%$, 染色强度与阳性细胞百分比的乘积即为最终结果。

1.7 统计学方法

以 PRISM 5 统计学软件分析。正态分布的计量资料采用单因素方差分析, 非正态分布的计量资料采用秩和检验。免疫组化结果采用 χ^2 检验进行统计分析, 组间的两两比较采用 Fisher 确切概率法。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肿瘤生长曲线比较

至实验结束, 各组无死亡, 全部进入指标检测, 每日观察动物生活情况, 各组动物能正常进食, 活泼, 无明显消瘦。自用药前1天开始, 每3 d 测1次肿瘤长短径, 直至用药结束。用药后前6 d, 各组肿瘤生长平缓, 体积比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。第6天后, 各组肿瘤生长出现差异, 联合用药组及化疗组生长曲线平缓, 但未停滞, 对照组生长较快, 曲线陡直。第12天, 联合用药组与化疗组比较有统计学差异, 实验结束各组体积比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。肿瘤生长曲线见图1, 用药结束, 各实验组瘤体质量分别为联合用药组 ($0.533 2 \pm 0.118 7$)g, 化疗组 ($0.795 4 \pm 0.102 6$)g, 内皮抑素组 ($1.127 7 \pm 0.154 9$)g, 对照组 ($1.257 4 \pm 0.342 6$)g, 联合用药组抑瘤率为64.63%, 化疗组抑瘤率为35.47%。

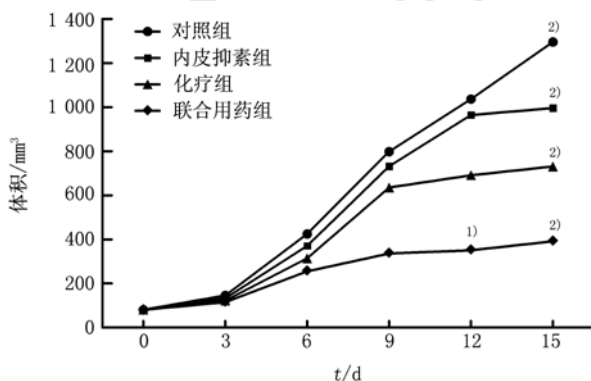


图1 各组肿瘤生长曲线

注: 与化疗组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 组间两两比较, ²⁾ $P < 0.05$

Fig 1 The tumor growth curve of each group

Note: Compared with NP group, ¹⁾ $P < 0.05$; pairwise comparison between groups, ²⁾ $P < 0.05$

2.2 免疫组化方法比较 MVD

采用vWF标记微血管, vWF蛋白阳性染色呈棕黄色, 定位于移植瘤微血管内皮细胞的细胞膜和(或)细胞质, 与其他组织分界清晰, 任何被vWF染成棕色的内皮细胞或内皮细胞簇, 必须与邻近微血管、肿瘤细胞和周围结缔组织分界清楚, 才可作为1个微血管计数, 管腔大于8个红细胞及有较厚肌层的血管不计数, 背景中阳性染色的浆细胞、白细胞依据形态排除。MVD计数: 联合用药组 18.57 ± 2.79 , 化疗组 23.13 ± 3.25 , 内皮抑素组 31.21 ± 4.24 , 对照组 39.74 ± 4.32 。联合用药组与其他3组MVD计数比较明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见图2。

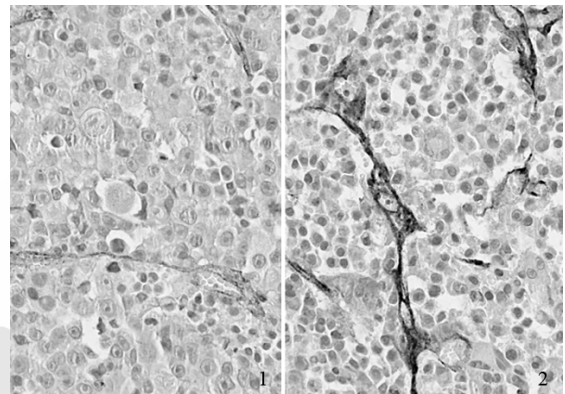


图2 联合用药组及对照组乳腺癌荷瘤小鼠瘤内组织 MVD (400 \times)

1-联合用药组; 2-对照组

Fig 2 MVD of rhES+NP group and the control group (400 \times)
1-rhES+NP group; 2-control group

2.3 免疫组化结果

VEGF蛋白阳性表达为棕黄色颗粒, 主要存在于细胞浆。HIF-1 α 的阳性染色产物主要表达于细胞浆, 部分细胞核被染成棕黄色至棕褐色。P53以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性, 见图3~5。与对照组及化疗组相比, 联合用药组的VEGF、HIF-1 α 和P53蛋白的表达均明显减少, 并且其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表1。

表1 乳腺癌荷瘤小鼠瘤内组织 VEGF、HIF-1 α 和 P53 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 The expression of VEGF, HIF-1 α and P53 in tumors ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	VEGF	HIF-1 α	P53
对照组	6.739 ± 0.794	6.217 ± 0.635	8.139 ± 0.931
内皮抑素组	$5.473 \pm 0.684^{1)}$	5.245 ± 0.721	$7.163 \pm 0.829^{1)}$
化疗组	$4.384 \pm 0.874^{1)}$	$4.187 \pm 0.649^{1)}$	$5.163 \pm 0.916^{1)}$
联合用药组	$3.351 \pm 0.674^{1), 2)}$	$3.115 \pm 0.631^{1), 2)}$	$3.648 \pm 0.652^{1), 2)}$

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与化疗组比较, ²⁾ $P < 0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with NP group, ²⁾ $P < 0.05$

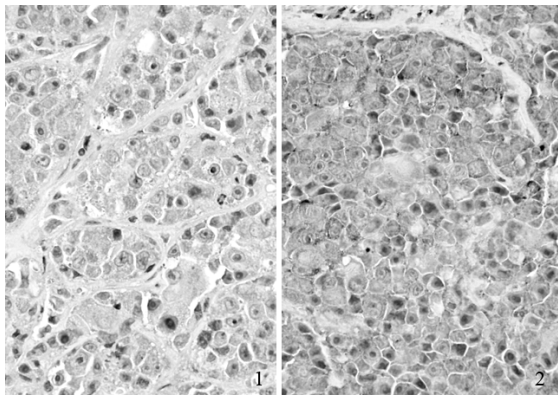


图3 联合用药组及对照组乳腺癌荷瘤小鼠瘤内组织 VEGF 的表达(400×)

1-联合用药组; 2-对照组

Fig 3 The expression of VEGF in rhES+NP group and the control group(400×)

1-rhES+NP group; 2-control group

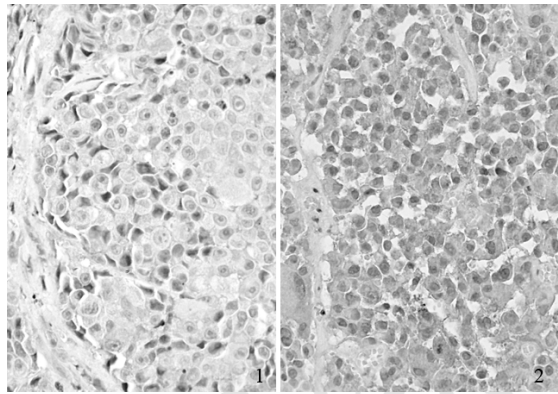


图4 联合用药组及对照组乳腺癌荷瘤小鼠瘤内组织 HIF-1α 的表达(400×)

1-联合用药组; 2-对照组

Fig 4 The expression of HIF-1α in rhES+NP group and the control group(400×)

1-rhES+NP group; 2-control group

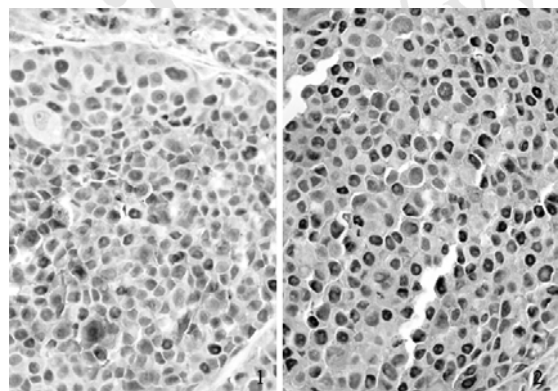


图5 联合用药组及对照组乳腺癌荷瘤小鼠瘤内组织 P53 的表达(400×)

1-联合用药组; 2-对照组

Fig 5 The expression of P53 in rhES+NP group and the control group(400×)

1-rhES+NP group; 2-control group

3 讨论

本研究除了观察rhES的抑瘤效应外,还特别比较了rhES对肿瘤血管生成数量及相关生成因子的影响。rhES可诱导新生血管内皮细胞凋亡^[7],从而抑制血管生成。同时亦可通过上调活性caspase-3的表达而直接抑制肿瘤细胞增殖^[8]。本研究中,观察到联合用药组抑瘤率为64.63%,化疗组抑瘤率为35.47%,且各组小鼠均无治疗相关性死亡,证实了rhES联合化疗对肿瘤的抑制效应。

与单用化疗组比较,联合用药组肿瘤血管的生长受到明显抑制,至实验结束,各组肿瘤体积比较有差异($P<0.05$)。由此可知,rhES联合化疗方案疗效优于单纯化疗及单纯抗血管生成治疗,这与彭星辰等^[9]运用重组人内皮抑素对肺癌进行研究实验结果一致。

肿瘤血管的生成受多种调节因子的影响,主要的促进因子有VEGF、成纤维细胞生长因子(bFGF)、TGF α/β 、雌激素、雄激素、前列腺素等^[10],其中最为重要的是VEGF,血管生成的始动需要血管生成因子^[11]。VEGF,能增加血管的通透性、促进内皮细胞的迁移、增生和肿瘤新生血管的生成,促进肿瘤的生长和转移。文献资料表明多数肿瘤中VEGF的表达与血管密度、恶性程度呈正相关,用VEGF抗体或可溶性受体抑制VEGF的作用可降低血管新生、肿瘤生长和转移,通过抑制肿瘤血管的生成治疗肿瘤已成为肿瘤治疗的一种重要手段。

内皮抑素的作用与VEGF信号通路有关,其通过抑制VEGF诱导的VEGFR-2(KDR/Flk-1)酪氨酸磷酸化和细胞外信号调节激酶(ERK)的活性来抑制血管生成和肿瘤细胞活性,抑制内皮细胞增殖,促使内皮细胞凋亡^[12]。内皮抑素也能下调肿瘤细胞表达VEGF,通过减少促血管形成因子的分泌,降低肿瘤细胞的转移能力^[13]。本实验观察到联合用药组VEGF表达较其他组明显减低($P<0.05$),这表明rhES能下调VEGF表达,进而达到抑制肿瘤血管生成,控制肿瘤生长的作用。

通过cDNA微阵列研究发现在内皮抑素干预的早期阶段,血管内皮细胞中发生了时间-剂量依赖性的基因表达改变,这种改变是在整个基因组水平上的(占人类基因的12%),而不是由特殊基因控制的。在内皮抑素的反应基因之中,许多基因具有调节血管形成的作用,例如:HIF-1 α 能够促进新生血管形成而使肿瘤进展,内皮抑素能下调

HIF-1 α 的表达,同时上调其拮抗因子HIF 1AN (hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor)的表达。另一个例子是内皮抑素上调血小板反应蛋白(thrombospondin, TSP)的表达,抑制Id-1 (inhibitor of DNA binding 1)的表达,解除后者对TSP表达的抑制作用,而TSP是一个重要的内源性血管形成抑制因子^[14]。可见, rhES对血管形成相关基因的表达具有双向调节作用,通过上调抗血管形成基因的表达和下调促血管形成基因的表达,放大了抗血管形成作用。本实验观察到联合用药组HIF-1 α 表达较对照组及化疗组明显减少($P<0.05$),说明内皮抑素能够下调HIF-1 α 的表达,从而下调促血管形成基因的表达。

P53是迄今发现的与人类肿瘤关系最为密切的基因,也是人类恶性肿瘤中最常见的突变基因,P53蛋白过度表达被认为是多种肿瘤预后不良的征兆^[15-17]。P53基因异常存在于50%以上的人类肿瘤。mtP53则促进P53基因的恶性转化,使其由抑癌基因转为原癌基因,与肿瘤的发生密切相关^[18]。正常细胞中P53蛋白半衰期短,仅10 min左右,含量极微,难以累积到免疫组织化学可检测量。而wtP53基因的表达产物半衰期更短,常规免疫组织化学方法难以检出;而P53突变后蛋白构型改变、稳定性增加、半衰期延长,从而易在恶性细胞中堆积,在癌细胞和转化细胞中常可高达100倍,能够用免疫组织化学方法检测。所以应用免疫组化检测的P53均为突变型,可作为多种癌的标志。P53基因突变与P53蛋白在组织中的表达是一致的^[19],因而可以认为,免疫组织化学检测阳性,即提示mtp53基因的存在。

有研究表明内皮抑素介导细胞凋亡与多个凋亡信号通路有关,其中包括通过让细胞内的钙和镁超载,从而调节P53和Bcl2的表达^[20]。本研究采用人乳腺MDA-MB-435S细胞株建立人乳腺癌裸鼠模型,该细胞株基因型为突变型P53,对化疗药物不敏感。本实验观察到联合用药组P53表达较对照组及化疗组明显减少($P<0.05$)。这表明内皮抑素可能通过调节P53的表达从而介导细胞凋亡,控制肿瘤进展。

本研究探讨了rhES联合化疗方案对人乳腺癌细胞裸鼠移植模型的作用及其机制。实验表明该方案能够有效控制裸鼠乳腺肿瘤生长,其机制可能为下调VEGF及HIF-1 α 的表达,而其对P53的作

用机制有待于更深一步的研究。

REFERENCES

- [1] WANG J W, SUN Y, LIU Y, et al. Results of phase III trial of rh-endostatin (YH-16) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients [J]. Chin J Lung Cancer(中国肺癌杂志), 2005, 8(4): 283-290.
- [2] LI Y P, GAO H, FENG Y, et al. Application of letrozole in neoadjuvant endocrine therapy for postmenopausal breast cancer with receptor positive [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(4): 365-369.
- [3] WEINDER N, SEMPLE J P, WELCH W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma [J]. N Engl J Med, 1991, 324(1): 1-8.
- [4] RAHMAN A, DHAR D K, YAMAGUCHI E, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5): 1325-1332.
- [5] BIRNER P, SCHINDL M, OBERMAIR A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer [J]. Cancer Res, 2000, 60(17): 4693-4696.
- [6] XU L Z. Breast Pathology (乳腺病理学) [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1999: 359-360.
- [7] WU S M, ZHAO Y A, YANG L, et al. Effects of recombinant human angiostatin on vascular endothelial cell [J]. Chin J Aesthet Med(中国美容医学), 2008, 17(5): 685-688.
- [8] YOU Z Y, ZHAO Y, LIU F, et al. The radiosensitization effects of Endostar on human lung squamous cancer cells H-520 [J]. Cancer Cell Int, 2010(10): 17.
- [9] PENG X C, LI H, TAN S S et al. The inhibition effect of endostatin and gemcitabine to lung cancer xenograft in nude mice [J]. Shandong Med J(山东医药), 2010, 50(21): 27-28.
- [10] HICKLIN D J. Promoting angiogenesis to a fault [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(3): 300-302.
- [11] BISCHOFF J, IGNATOV A. The role of targeted agents in the treatment of metastatic breast cancer [J]. Breast Care (Basel), 2010, 5(3): 134-141.
- [12] FOLKMAN J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(5): 594-607.
- [13] FERNANDO N T, KOCH M, ROTHROCK C, et al. Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5): 1529-1539.
- [14] ABDOLAH A, HALLNFELDT P, MAELKER C, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network [J]. Mol Cell, 2004, 13(5): 649-663.
- [15] YAN Y X, ZHANG S P, HUA J. The progression of P53 [J]. J Beijing Univ Agri(北京农学院学报), 2009, 24(2): 74-77.
- [16] QI J, YANG S Q, LIU S Z. Effects of tetrodotoxin cardioplegia on cardiomyocyte apoptosis and related protein expression in rat hearts [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(3): 193-197.
- [17] YAMAGUCHI A, KUROSAKA Y, FUSHIDA, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis [J]. Cancer, 1992, 70(12): 2778-2784.
- [18] PULSIEUX A, LIM S, GROPPMAN J, et al. Selective targeting of p53 gene mutational hot spots in human cancers

by etiologically defined carcinogens [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(22): 6185-6188.

- [19] CHEN X M. The progression of P53 gene [J]. *Mod Diagn Treat*(现代诊断与治疗), 2008, 19(3): 158-160.

- [20] REN B, WANG Y, et al. Multiple signaling is involved in endostatin-mediated apoptosis in ECV 304 endothelial cells [J]. *Front Biosci*, 2005, 1(10): 1089-1097.

收稿日期: 2011-05-03