

Rh-Endostatin 作用肺癌血管正常化时相与 CA9 表达的关系初探*

何朗¹, 孙永红¹, 刘康², 徐幸幸¹, 杨蜜¹, 吴迅³, 蒋莉^{4△}

1. 川北医学院第二临床医学院 四川省南充市中心医院 肿瘤中心 (南充 637000);

2. 川北医学院 组织工程与干细胞研究所 (南充 637000); 3. 川北医学院 临床医学系 (南充 637000);

4. 川北医学院第二临床医学院 四川省南充市中心医院 呼吸科 (南充 637000)

【摘要】 目的 初步探索重组人血管内皮抑素(rh-Endostatin, rh-ES)作用于肺癌的血管正常化时相与 CA9 的关系,以及 CA9 在肺癌中的表达水平。方法 收集对数生长期的 Lewis 细胞,制成 1×10^6 mL⁻¹ 的单细胞悬液,注射入 40 只 C57/BL6 小鼠(0.2 mL/只),建立 Lewis 肺癌皮下移植瘤(LLC)模型,然后随机分成对照组和 rh-ES 组,各 20 只。rh-ES 组小鼠腹腔注射 rh-ES 5 mg/(kg·d),9 d,1 次/d。对照组小鼠同时点腹腔注射生理盐水(NS) 0.2 mL/次。于治疗第 2、4、6、9 天,每组各处死 5 只小鼠。免疫组化检测肿瘤组织和癌旁组织中 CA9 表达,Real-time PCR 及 ELISA 技术分别检测两组不同时间点肿瘤组织中 CA9 表达。结果 C57/BL6 小鼠成瘤率为 100%。同时,对照组不同时间点 CA9 在肿瘤组织中表达均高于癌旁组织($P < 0.05$)。Real-time PCR 及 ELISA 发现在 LLC 移植瘤模型中 CA9 基因和蛋白表达在 rh-ES 组给药后第 4 天和第 6 天(血管正常化时相)降低,与同组第 2 天、第 9 天比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与对照组第 4 天和第 6 天比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CA9 在肿瘤组织中高表达。rh-ES 可于血管正常化时间段内降低 CA9 表达,逆转 Lewis 肺癌乏氧。

【关键词】 重组人血管内皮抑素 Lewis 肺癌 CA9

Study on the Relationship Between Normalization of Tumor Microvessels and CA9 for Rh-Endostatin to Inhibit Lewis Lung Cancer HE Lang¹, SUN Yong-hong¹, LIU Kang², XU Xing-xing¹, YANG Mi¹, WU Xun³, JIANG Li^{4△}. 1. Cancer Center, the Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China; 2. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, North Sichuan Medical College, Nanchong, 637000, China; 3. Department of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, 637000, China; 4. Department of Respiration, the Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China

△ Corresponding author, E-mail: lanqilily@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the relationship between normalization of tumor microvessels and CA9 for rh-Endostatin to inhibit Lewis lung cancer (LLC) and the expression level of CA9 in LLC. **Methods** Lewis cells of logarithmic growth phase were collected and made into 1×10^6 mL⁻¹ cell suspensions were prepared. The transplanted tumor model of LLC was established on C57/BL6 mice by injected 0.2 mL cell suspensions/mice into 40 C57/BL6 mice. 40 LLC mice were randomly divided into control group and rh-ES group (20 mice per group). Control group experienced treatment of intraperitoneal injection (ip) for 0.2 mL NS/d, while rh-ES group was treated for 5 mg rh-ES/(kg·d) from the first to the ninth day. The samples of 5 mice were obtained from day 2, day 4, day 6 and day 9 after treatment in control group or rh-ES group, respectively. CA9 was tested by IHC in LLC and paracancerous tissues and estimated by RT-PCR and ELISA in the each time point of both rh-ES group and control group, respectively. **Results** The transplanted tumor model of LLC on C57/BL6 mice was established successfully. The expression of CA9 decreased on day 4 and day 6 in rh-ES group estimated by RT-PCR and ELISA, which indicated some great significance when compared with day 2, day 9 in rh-ES group and day 4, day 6 in control group ($P < 0.05$), and the expression of CA9 in day 2, day 4, day 6, day 9 tested by IHC was higher in

* 国家自然科学基金(No. 81372504),四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2014SZ0020-7),四川省卫计委重点学科科研课题(No. 150092),四川省卫生厅科研项目(No. 130466, No. 120284, No. 100343),南充市科技局应用技术与开发资金项目(No. 15A0023, No. 13A0061),川北医学院博士启动基金(No. CBY15-QD09)和川北医学院科研发展计划重点培育项目(No. CBY13-A-ZP23)资助

△ 通信作者, E-mail: lanqilily@163.com

LLC than in paracancerous tissues in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of CA9 was higher in LLC. Rh-ES could have positive effect on LLC model of C57/BL6 mice, in day 4-6 (a brief normalized time course) decreased the expression of CA9 and reversed the tumor hypoxia.

【Key words】 rh-Endostatin Lewis lung cancer CA9

1971年 FOLKMAN 教授首次提出了肿瘤血管生成依赖学说^[1],他指出肿瘤新生血管生成与肿瘤微环境之间相互作用,肿瘤血管生成不仅为肿瘤生长过程所必需,而且在肿瘤的侵袭和转移阶段也起到关键作用。肿瘤血管结构的改变意味着其功能的改变。直接和间接的抗血管生成治疗都可能使肿瘤内部的乏氧状态在肿瘤血管正常化时间段内发生变化,这一观点已逐步被大量临床前和临床研究所证实^[2-4]。已知人类肿瘤内部普遍存在着乏氧,而肿瘤形成和发展中对乏氧的适应是其发展的一个关键步骤。乏氧可导致耐药及肿瘤进展。肿瘤血管的正常化过程意味着乏氧状态的逆转^[5]和对放化疗敏感性的提高。因此,肿瘤血管的正常化对于抗肿瘤治疗非常重要,可以增加抗肿瘤治疗的疗效。

CA9 是一种膜结合蛋白,是碳酸酐酶家族异构体之一,是由酸性氨基酸组成的分布于细胞膜和细胞核的跨膜糖蛋白。近年来随着对 CA9 研究的深入,发现 CA9 表达和肿瘤内部氧分压之间具有较好的相关性,其表达增加预示着乏氧程度的加重,提示 CA9 可能作为乏氧内源性生物学指标,反映肿瘤的发生发展及不良预后^[6]。我国自主研发的重组人血管内皮抑素(rh-Endostatin, rh-ES)是一种抗血管生成药物。rh-ES 的Ⅳ期临床研究显示肿瘤内部的微环境及其氧合状态能被 rh-ES 有效改变,且肿瘤内部的无效血流减少,从而达到“血管正常化”状态^[7]。我们的前期研究成果已经初步证实在 rh-ES 作用第 4~6 天可能为血管正常化时间窗^[8]。那么, rh-ES 作用于血管内皮细胞,其在血管正常化阶段是否与乏氧相关,能否改善肿瘤乏氧微环境,促进肿瘤凋亡? 在这个血管正常化阶段, CA9 如何变化,以及 CA9 在肿瘤中的表达意义如何? 我们对此进行了初步探索。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠肺癌 LLC 细胞购于四川大学生物治疗国家重点实验室。40 只 6~8 周龄 15~20 g 雌性 C57/BL6 小鼠,购自川北医学院动物实验中心。rh-ES(15 mg/3 mL)购于山东先声麦得津生物制药有

限公司,CA9 兔抗小鼠单克隆抗体购于福建迈新生物技术公司,SABC 免疫组化试剂盒购于 Santa Cruz 公司,E. Z. N. A. TM Total RNA Kit I 提取试剂盒和 cDNA 合成试剂盒购于 OMEGA 公司,CA9 ELISA 试剂盒购于优尔生公司。

1.2 建立小鼠 LLC 皮下移植瘤模型

收集对数生长期的 Lewis 细胞,制成密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液;0.2 mL/只皮下注射入 40 只 C57/BL6 小鼠左侧腋下,观察、记录 LLC 小鼠生长及成瘤情况。

1.3 分组治疗和标本处理

按掷硬币法将 40 只 LLC 小鼠随机分成对照组和 rh-ES 组各 20 只,待移植瘤长径达 6 mm 左右时开始分组治疗。对照组小鼠腹腔注射生理盐水(NS)0.2 mL/d,9 d,1 次/d;rh-ES 组小鼠腹腔注射 rh-ES 5 mg/(kg·d),9 d,1 次/d。于治疗第 2、4、6、9 天每组各处死小鼠 5 只用于检测 CA9 基因和蛋白表达。小鼠一部分肿瘤标本离体 30 min 内迅速放入 -186°C 液氮罐,在 30 min 内保存至 -80°C 超低温冰箱等待提取 RNA 和蛋白;对照组部分肿瘤标本和癌旁组织标本放入体积分数 4% 甲醛溶液中固定,脱水、透明、浸蜡、包埋及切片。

1.4 免疫组化染色检测对照组肿瘤组织及癌旁组织中 CA9 的表达

采用 SABC 法进行免疫组化(IHC)染色。石蜡切片脱蜡至水, H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 5 min,先后 2 次置于摇床后行高压锅抗原修复。修复后上摇床,PBS 洗涤 2 次,正常血清封闭孵育 1 h 后用滤纸吸去血清,直接滴加 CA9 单克隆抗体(稀释浓度 1:100), 4°C 冰箱过夜。PBS 洗涤 2 次(置于摇床),滴加生物素化的二抗, 37°C 孵育 40 min 后 PBS 洗涤 2 次,滴加 SAB 复合物三抗, 37°C ,40 min。PBS 洗涤 2 次后 DAB 显色,镜下观察,适时终止。自来水充分冲洗,苏木素复染,自来水冲洗返蓝,梯度酒精脱水。阳性对照采用已知阳性切片;阴性对照用 PBS 液代替一抗。

CA9 蛋白以细胞膜/部分细胞核呈棕黄色颗粒为阳性表现。其结果判断标准参照文献^[9],分为染色强度(0~3 级:0,阴性;1,弱阳性;2,阳性;3,强阳

性)和阳性细胞比例(0~4级:0,阴性;1,阳性细胞比例 1%~25%;2,阳性细胞比例 26%~50%;3,阳性细胞比例 51%~75%;4,阳性细胞比例 76%~100%)。根据阳性细胞比例+染色强度进行评分,阳性为 ≥ 3 分。任意选取 5 个 400 倍视野,计算 1000 个肿瘤细胞中的阳性细胞个数。以标记指数(LI)记录结果,LI为(阳性细胞数/1000) $\times 100\%$ 。

1.5 PCR 检测两组小鼠肺癌组织 CA9 的表达

小鼠肿瘤标本总 RNA 通过提取试剂盒提取。mRNA 提取后通过 Fermentas 试剂盒说明进行 cDNA 合成。

小鼠的 *GAPDH*、*CA9* 基因序列在 GenBank 中查询,引物序列通过 Primer 5 设计,设计成功后通过 NCBI 的 primer Blast 网站对比。上海捷瑞公司合成设计后的引物:内参基因 *GAPDH*,上游引物,5'-AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC-3',下游引物,5'-CGAAGGTGGAAGAGTGCGAGTTG-3',扩增产物长度 112 bp; *CA9*,上游引物,5'-TGTGGGGACCTCGTGATTCTCG-3',下游引物,5'-TGGACTGGCTCAGGGCT GCTAT-3',扩增产物长度 112 bp。扩增反应体系如下:2 \times SYBR Mixture 10 μ L,5 \times Reaction Buffer 4 μ L,上、下游引物各 1 μ L,cDNA 2 μ L,RNase-Free Water 3 μ L,总体积 21 μ L。*GAPDH* 及 *CA9* 基因片段通过 Real-time PCR 扩增,扩增条件:变性,95 $^{\circ}$ C,1 min;退火温度,59 $^{\circ}$ C,30 s;延伸 72 $^{\circ}$ C,1 min,40 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得出目的基因 *CA9* 的相对表达量。

1.6 ELISA 检测两组小鼠肿瘤标本中 CA9 蛋白的

表达

将肿瘤组织制备好的匀浆液离心留取上清,设置标准孔、空白孔、待测样品孔。标准孔设为 7 孔,不同浓度的标准品 100 μ L 依次加入每孔,样品稀释液 100 μ L 加入空白孔,待测样品 100 μ L 亦分别加入剩余孔。按试剂盒说明进行操作,最后绘制标准曲线。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行多组数据组间比较,进一步两两比较行 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠 LLC 成瘤情况

C57/BL6 小鼠成瘤率为 100%。小鼠皮下接种 LLC 细胞后第 10 天,皮下移植瘤直径长至约 6 mm,质硬,活动度差,肿瘤呈膨胀性生长,呈类球形。见图 1。

2.2 对照组肿瘤组织及癌旁组织中 CA9 蛋白的表达

见图 2。CA9 蛋白阳性以细胞膜/核呈现棕黄色颗粒为主。IHC 提示肿瘤组织中不同时间点 CA9 的表达阳性程度均显著高于癌旁组织,第 2、4、6、9 天肿瘤组织中各 LI 分别为(90.10 \pm 3.85)%、(61.98 \pm 4.98)%、(63.62 \pm 3.68)%、(80.15 \pm 3.96)%、癌旁组织中各时间点 LI 分别为(45.87 \pm 3.70)%、(35.64 \pm 2.72)%、(38.86 \pm 3.20)%、(42.36 \pm 4.10)%、肿瘤组织各时间点

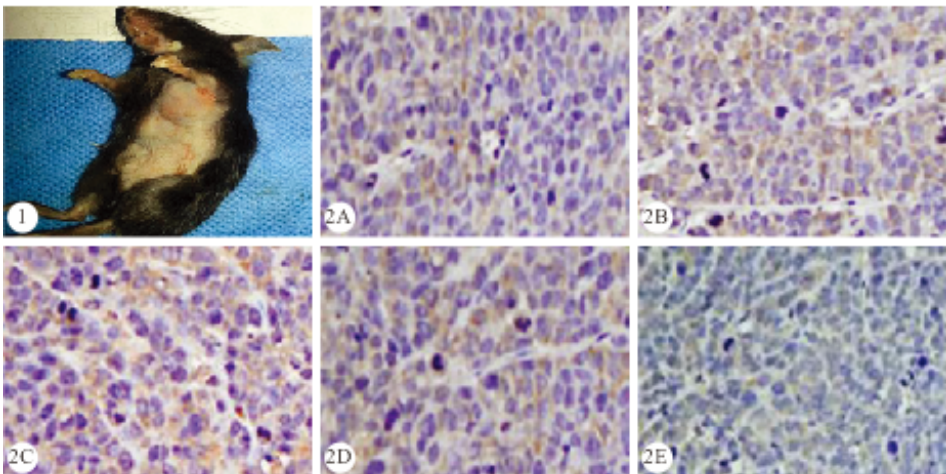


图 1 LLC 移植瘤模型

图 2 LLC 移植瘤模型肿瘤组织和癌旁组织中 CA9 的表达。SABC $\times 400$

Fig 1 The transplanted tumor model of LLC

Fig 2 Expression of CA9 in LLC (A-D, day 2, 4, 6 and 9, respectively) and paracancerous tissues (E, day 4). SABC $\times 400$

CA9 的表达均高于癌旁组织,而肿瘤组织第 4 天、第 6 天 CA9 的表达分别低于第 2 天、第 9 天的表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 rh-ES 作用不同时间肿瘤组织中 CA9 mRNA 变化

CA9 mRNA 水平在 rh-ES 组第 2 天、第 9 天时的表达与对照组比较差异无统计学意义,第 4 天、第 6 天较对照组降低($P < 0.05$);rh-ES 组第 4 天、第 6 天与同组第 2 天、第 9 天相比,CA9 mRNA 水平降低($P < 0.05$)。同时,CA9 mRNA 水平在对照组第

4 天、第 6 天的表达与同组第 2 天、第 9 天表达的比较差异未见统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 rh-ES 作用不同时间肿瘤组织中 CA9 蛋白的表达

见表 2。rh-ES 组 CA9 表达在第 4 天、第 6 天低于同组第 2 天、第 9 天,差异有统计学意义($P < 0.05$);rh-ES 组与对照组第 4 天、第 6 天比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组 CA9 表达在第 4 天、第 6 天与同组第 2 天、第 9 天比较,以及 rh-ES 组 CA9 表达在第 2 天、第 9 天与对照组第 2 天、第 9

表 1 实时荧光定量 PCR 检测小鼠 LLC 模型 CA9 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of CA9 mRNA in LLC by RT-PCR ($\bar{x} \pm s$)

Group	Day 2 (n=5)	Day 4 (n=5)	Day 6 (n=5)	Day 9 (n=5)
rh-ES	2.898±1.544	1.363±0.927 Δ ·*	1.099±0.456 Δ ·*	2.334±1.367
Control	2.321±1.364	3.934±1.529	3.403±0.977	2.208±0.878

$\Delta P < 0.05$, vs. day 2 and day 9 in the same group; * $P < 0.05$, vs. control group at the same time point

表 2 ELISA 检测小鼠 LLC 模型 CA9 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Table 2 Expression of CA9 in LLC by ELISA ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Group	Day 2 (n=5)	Day 4 (n=5)	Day 6 (n=5)	Day 9 (n=5)
rh-ES	146.45±6.28	88.63±6.16 Δ ·*	83.98±5.76 Δ ·*	168.20±8.02
Control	148.12±7.22	166.56±5.12	180.51±5.65	189.28±7.60

$\Delta P < 0.05$, vs. day 2 and day 9 in the same group; * $P < 0.05$, vs. control group at the same time point

天表达的比较差异均未见统计学意义($P > 0.05$)。

佳。

3 讨论

抗血管生成作为一种有效的肿瘤治疗手段,已经成为除手术、放化疗之外的另一种肿瘤治疗模式,既可阻断肿瘤侵袭脉管系统,又可抑制微小病灶增殖^[10]。血管生成是所有实体瘤的共性。研究^[1]发现,在肿瘤的演变过程中存在一个表型转换,即从无血管期到血管生成期的演变过程。肿瘤新生血管的血管壁通透性和组织间压力较之正常血管壁明显增高,且结构紊乱、畸形,管腔内缺氧、酸性物质堆积,管腔外缺乏完整的周细胞覆盖,并存在动静脉瘘^[11-12]。由于肿瘤的血管分布异质性导致肿瘤供血的不均匀,部分肿瘤细胞处于缺氧状态,对放射线和化疗药物的敏感性下降,这一特点限制了抗肿瘤治疗的疗效。临床抗肿瘤治疗的目的是要使所有肿瘤细胞都能充分接触药物或射线从而产生最大的治疗效应。研究显示:抗血管生成药物合理的给药时间可以使增生扭曲紊乱的肿瘤血管趋于正常,氧气和药物能充分到达肿瘤细胞,使其内部的缺氧状态逆转,抗肿瘤疗效提高^[13-14]。研究已证实一些抗肿瘤血管药物如 DC101^[15]、沙利度胺^[2]、贝伐单抗^[16]等均存在血管正常化时间窗,在该时间窗内,肿瘤新生血管形态结构趋于正常,缺氧逆转,抗肿瘤疗效最

本研究发现:CA9 基因和蛋白在 rh-ES 给药后第 4 天和第 6 天表达低于同组第 2 天、第 9 天和对照组第 4 天、第 6 天,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示在该时间段肿瘤细胞的缺氧状态已得到明显改善,在该正常化时间窗内(第 4~6 天),CA9 表达减少,缺氧得到逆转,抗肿瘤疗效可能更佳。分析其机制,可能是在 rh-ES 治疗初始,缺氧散布于整个微环境,酸性物质大量堆积,CA9 表达较高。机体通过水解来维持细胞自身稳态及肿瘤的增殖活性。当到第 4 天和第 6 天时,出现一血管短暂正常化过程,肿瘤血管排列有序,血供恢复,CA9 降低,缺氧得到改善^[17]。同时,在缺氧环境下,CA9 可以阻止细胞凋亡,反之,在血管正常化状态,缺氧状态逆转,CA9 则促进凋亡。某种程度上,抗血管生成药物对肿瘤微血管的损伤也不可避免地阻碍氧气和药物的正常输送,增加肿瘤缺氧,可能导致抗肿瘤疗效下降和肿瘤转移概率的增大。因此,只有在肿瘤血管正常化时间窗出现后,肿瘤微血管结构和功能方趋于正常,在该阶段缺氧短暂逆转,此时用药,可提高抗肿瘤疗效^[18]。

另外,文献已报道 CA9 蛋白在胃癌^[19]、肾癌^[20]、非小细胞肺癌^[21]等多种肿瘤中过度表达,且其过表达与肿瘤对放化疗的抗拒及不良预后有关,

并在其发生、发展过程中起着重要作用,被认为是一种潜在的肿瘤早期诊断指标^[17]。我们也进行了初步探索:通过免疫组化发现 CA9 在 Lewis 肺癌组织不同时间点均显著高于癌旁组织,与国内外研究的结果类似,说明 CA9 在肿瘤的发生、发展过程中扮演着重要角色,其表达增高可能预示着肿瘤的发展,有可能对肿瘤的早期诊断提供一定参考价值。IHC 检测发现对照组肿瘤组织第 4 天、第 6 天 CA9 的表达分别低于第 2 天、第 9 天,而其后 ELISA 检测发现对照组肿瘤组织 CA9 的蛋白表达随时间递增。两者的检测结果似乎矛盾,分析原因,可能与样本量过小、试验误差以及不同检测方法的精度(IHC 仅仅为一半定量检测手段)有关。

CA9 虽然可能对肺癌的早期诊断有一定价值,但遗憾的是,CA9 随时间变化的规律尚不得而知,是否在早期足够敏感,且达到何种程度的阳性率可以用于诊断肺癌目前均是未知数,这将是我们的下一步研究的重点。我们希望通过该指标的深入研究,以期对肺癌的个体化诊治提供一个新思路。

参 考 文 献

[1] FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16):15-18.

[2] AUSIAUX R, BAUDELET C, JORDAN BF, *et al.* Thalidomide radiosensitizes tumors through early changes in the tumor, microenvironment. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(2Pt1):743-750.

[3] HURWITZ H, FEHRENBACHER L, NOVOTNY W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, 350(23):2335-2342.

[4] WINKLER F, KOZIN SV, TONG RT, *et al.* Kinetics of vascular nor realization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation; role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*, 2004, 6(12):553-563.

[5] JAIN RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*, 2001, 7(9):987-989.

[6] OLIVE PL, AQUINO-PARSONS C, MACPHAIL SH, *et al.* Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Res*, 2001, 61(24):8924-8929.

[7] LEE CG, HEIJN M, DI TOMASO E, *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res*, 2000, 60(19):5565-5570.

[8] 何 朗, 孙永红, 蒋 莉, 等. Rh-Endostatin 与肿瘤血管正常化时相的关系初探. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(19):1291-1296.

[9] RAHMAN MA, DHAR DK, YAMAGUCHI E, *et al.*

Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver; possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5):1325-1332.

[10] 王成昆. 重组血管基膜衍生多功能肽(rVBMDMP)抗非小细胞肺癌的作用及机制研究. 长沙:中南大学, 2010[2017-01-10]. <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD0911&filename=2010185558.nh&v=MTI2NDVMMmZaT2R0Rnk3bVY3dkxWMTI2SHJld0c5VEpwNUViUEISOGVYMUxleFITN0RoMVQzcVRyV00xRnJlDVVI=>.

[11] STEFANSSON IM, SALVESEN HB, AKSLEN LA. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. *Cancer Res*, 2006, 66(6):3303-3309.

[12] WELEN K, JENNBACKEN K, TESAN T, *et al.* Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2009, 12(1):41-46.

[13] PENG F, XU Z, WANG J, *et al.* Recombinant human endostatin normalizes tumor vasculature and enhances radiation response in xenografted human nasopharyngeal carcinoma models. *PLoS One*, 2012, 7(4):e34646[2016-12-21]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034646>.

[14] GOEL S, DUDA DG, XU L, *et al.* Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*, 2011, 91(3):1071-1121.

[15] TONG RT, BOUCHER Y, KOZIN SV, *et al.* Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res*, 2004, 64(11):3731-3736.

[16] HURWITZ H, FEHRENBACHER L, NOVOTNY W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, 350(23):2335-2342.

[17] SHIN HJ, KHO SB, JUNG DC, *et al.* Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt7):1077-1087.

[18] FERRARA N, HILLAN KJ, GERBER HP, *et al.* Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug*, 2004, 3(5):391-400.

[19] NAKAMURA J, KITAJIMA Y, KAI K, *et al.* Expression of hypoxic marker CA IX is regulated by site-specific DNA methylation and is associated with the histology of gastric cancer. *Am J Pathol*, 2011, 178(2):515-524.

[20] STEWART GD, O' MAHONY FC, LAIRD A, *et al.* Carbonic anhydrase 9 expression increases with vascular endothelial growth factor-targeted therapy and is predictive of outcome in metastatic clear cell renal cancer. *Eur Urol*, 2014, 66(5):956-963.

[21] LLIE M, HOFMAN V, ZANGARI J, *et al.* Response of CA IV and CA III to *in vitro* re-oxygenation and clinical significance of the combined expression in NSCLC patients. *Lung Cancer*, 2013, 82(1):16-23.

(2017-01-25 收稿, 2017-03-09 修回)

编辑 吕 熙