

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.003

· 基础研究 ·

## *APE1* siRNA 重组腺病毒增强贝伐单抗对移植骨肉瘤的治疗作用

仲召阳<sup>1</sup>, 张沁宏<sup>2</sup>, 卿毅<sup>1</sup>, 李梦侠<sup>1</sup>, 李增鹏<sup>2</sup>, 王东<sup>1\*</sup> (1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, 重庆 400042; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科, 重庆 400042)

[摘要] 目的: 探讨以 DNA 损伤修复基因脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶基因( *apurinic/aprimidinic endonuclease-1, APE1* )为靶点的 siRNA 在骨肉瘤治疗中的作用及其与贝伐单抗( bevacizumab, Avastin )的协同效应。方法: 建立人骨肉瘤 9901 细胞荷瘤裸鼠模型, 16 只荷瘤鼠随机分为 4 组: EGFP 对照组, *APE1* siRNA 治疗组, Avastin 治疗组和联合治疗组( Avastin + *APE1* siRNA )。观察移植瘤生长情况并计算抑瘤率, 免疫组织化学法检测肿瘤组织微血管密度和 Ki67 表达, TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡, 激光共聚焦检测肿瘤组织的缺氧状态, Western blotting 检测肿瘤组织内 VEGF 蛋白的表达。结果: 与 *APE1* siRNA 治疗组和 Avastin 治疗组相比, Avastin + *APE1* siRNA 治疗组的抑瘤率显著增加(  $P < 0.01$  )。各治疗组的微血管密度及 Ki67 表达明显低于对照组, 且 Avastin + *APE1* siRNA 治疗组微血管密度和 Ki67 表达显著低于单独治疗组(  $P < 0.01$  )。各治疗组的凋亡指数明显高于对照组, 且 Avastin + *APE1* siRNA 治疗组明显高于单独治疗组(  $P < 0.01$  )。*APE1* siRNA 或 Avastin 治疗均可引起肿瘤组织缺氧, 抑制肿瘤组织中 VEGF 的表达, Avastin + *APE1* siRNA 治疗效果更加明显。结论: 以 *APE1* 为靶点的 siRNA 能显著抑制裸鼠移植骨肉瘤的血管生成和瘤体生长, 并诱导肿瘤细胞凋亡, 且与 Avastin 具有协同作用。

[关键词] 骨肉瘤; siRNA; 脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶; 贝伐单抗; 抗血管生成; 凋亡

[中图分类号] R738.1; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)04-0331-05

## Recombinant adenovirus *APE1* siRNA enhances efficacy of bevacizumab on implanted osteosarcoma

ZHONG Zhao-yang<sup>1</sup>, ZHANG Qin-hong<sup>2</sup>, QING Yi<sup>1</sup>, LI Meng-xia<sup>1</sup>, LI Zeng-peng<sup>2</sup>, WANG Dong<sup>1\*</sup> (1. Cancer Center, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Pathology, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *APE1*-targeting siRNA (*APE1* siRNA) on implanted osteosarcoma and its synergetic role with bevacizumab (vascular endothelial growth factor antibody, Avastin). **Methods:** Human osteosarcoma 9901 cell-bearing nude mouse model was established. Sixteen tumor-bearing mice were randomly divided into 4 groups: EGFP control group, *APE1* siRNA group, Avastin group and combined treatment group (Avastin + *APE1* siRNA). The growth of implanted tumors was measured during treatment, and tumor inhibitory rate was calculated. Meanwhile, microvessel density (MVD) and Ki67 expression in tumor tissues were examined by immunohistochemistry. Apoptosis of tumor cells was examined by TUNEL. Hypoxia status of tumor tissues was determined by laser cofocal scanning microscopy. Expression of VEGF protein in tumor tissues was detected by Western blotting. **Results:** The tumor inhibitory rate of Avastin + *APE1* siRNA group was significantly increased compared with those of *APE1* siRNA group and Avastin group (  $P < 0.01$  ). The MVD and Ki67 expressions in therapy groups were significantly lower than those in control group; moreover, the MVD and Ki67 expressions in Avastin + *APE1* siRNA group were remarkably lower than those in *APE1* siRNA group or Avastin group (  $P < 0.01$  ). The apoptosis index (AI) in therapy groups was significantly higher than that in control group, with AI in Avastin + *APE1* siRNA group being markedly higher than those in the other two groups (  $P < 0.01$  ). Hypoxia status in tumor tissues was enhanced and VEGF expression was inhibited in *APE1* siRNA group or Avastin group; furthermore, hypoxia status and VEGF expression in Avastin + *APE1* siRNA group were greatly changed. **Conclusion:** *APE1*-targeting siRNA can inhibit the angiogenesis and growth of implanted osteosarcoma, and induce apoptosis of

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目( No. 30801368 )。Supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 30801368 )

[作者简介] 仲召阳( 1977- ), 男, 江苏省连云港市人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤分子靶向治疗的研究。E-mail: zhongzhaoyang08@hotmail.com

\* 通信作者( Corresponding author )。E-mail: dongwang64@hotmail.com

tumor cells, which shows a synergistic role with Avastin in the treatment of osteosarcoma.

[ **Key words** ] osteosarcoma; siRNA; apurinic/aprimidinic endonuclease-1( *APE1* ); bevacizumab; antiangiogenesis; apoptosis  
[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 331-335 ]

骨肉瘤是多发于青少年的富含血管的高度恶性肿瘤,其对放、化疗抵抗,临床治疗效果不佳。肿瘤基因治疗和抗肿瘤血管生成治疗已成为包括骨肉瘤在内的多种实体瘤治疗新策略。DNA 损伤修复基因脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶( apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1, *APE1/Ref-1* )具有核酸内切酶及氧化还原双功能,系低氧诱导细胞凋亡的重要保护基因,推测其与抗肿瘤血管生成的耐药性有关<sup>[1-3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>发现,靶向敲除 *APE1* 能显著抑制裸鼠骨肉瘤的生长,联合应用内皮抑素具有明显的协同作用,表明以 *APE1* 为靶点的分子治疗和抗血管生成治疗在骨肉瘤中具有协同作用。贝伐单抗( bevacizumab, Avastin )是人源化抗 VEGF 单抗,含有 93% 的人 IgG 骨架和 7.0% 的鼠源结合区域能有效地抑制骨肉瘤细胞诱导的微血管生成,是骨肉瘤抗血管生成治疗的最重要靶向药<sup>[5-6]</sup>。本研究通过观察 Avastin 疗法联合靶向敲除 *APE1* 疗法对骨肉瘤细胞株 9901 裸鼠移植瘤的作用,初步探讨 *APE1* 和 Avastin 联合治疗的作用机制,为联合 VEGF 为靶点的抗血管生成疗法和 *APE1* 为靶点的基因治疗骨肉瘤提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和细胞

Ad5/F35-*APE1* siRNA 重组腺病毒由本课题组向德兵博士构建,已获得国家专利( No. 200710164312 )。EF5 { 2-[ 2-nitro-1 H-imidazol-1-yl ]-N-( 2, 2, 3, 3, 3-pentafluoropro-pyl acetamide } 为缺氧细胞的标记物,具有恒定的氧依赖性结合特性<sup>[7-8]</sup>,由大坪医院病理科肖华亮博士馈赠。Avastin ( 贝伐单抗,美国 Genentech )、Ki67、CD31 鼠抗人单克隆抗体、TUNEL 凋亡试剂盒和 Histostain<sup>TM</sup> 试剂盒均购自北京中山公司。鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自 Santa cruz 公司,HRP 标记的羊抗鼠二抗和化学发光试剂盒购自 Pierce 公司。人骨肉瘤细胞株 9901 由第四军医大学西京医院骨科研究所范清宇教授馈赠。

### 1.2 裸鼠荷瘤及实验分组

BALB/c 裸鼠( 购自大坪医院动物中心,动物合格证号: 0083940 ), 3 ~ 4 周龄。取对数生长期的 9901 细胞, 0. 25% 胰酶消化后,用磷酸盐缓冲液调

整细胞密度至  $5 \times 10^7$  /ml, 在裸鼠腋下接种 0. 2 ml。待肿瘤生长至体积约 40 mm<sup>3</sup> 时分组: Ad5/F35-EGFP 对照组( 瘤内注射  $5 \times 10^8$  IU 的 Ad5/F35-EGFP 对照液 50  $\mu$ l, 简称 EGFP ); Ad5/F35-*APE1* siRNA 组( 瘤内注射  $5 \times 10^8$  IU 的 Ad5/F35-*APE1* siRNA 病毒 50  $\mu$ l, 简称 *APE1* siRNA ); Avastin 组[ Avastin 2 mg/( kg · w ) 瘤体注射, 每周 1 次, 共 2 次 ]; 联合治疗组( Avastin + Ad5/F35-*APE1* siRNA, 即 Avastin + *APE1* siRNA )。

### 1.3 移植瘤生长观察

用药期间每日测量鼠重、肿瘤长径和短径, 肿瘤体积 = 1/2 长径 × 短径<sup>2</sup>。治疗第 14 天处死动物, 剥离肿瘤, 计算抑瘤率( tumor inhibition rate, TIR ), TIR( % ) = ( 对照组肿瘤体积 - 实验组肿瘤体积 ) / 对照组肿瘤体积 × 100%。绘制移植瘤生长曲线。

### 1.4 免疫组织化学法检测 Ki67 和 CD31 的表达

处死动物后, 在无菌条件下取出肿瘤, 1/3 用于免疫组化, 1/3 用于荷瘤缺氧标记以及血管构筑, 1/3 用于 Western blotting 检测 VEGF 蛋白。S-P 法免疫组化染色检测 Ki67、CD31 的表达以反映肿瘤细胞的增殖和微血管密度( microvessel density, MVD ), 具体步骤参照试剂盒说明进行。Ki67 阳性率( % ) = ( 阳性细胞数/细胞总数 ) × 100%。CD31 标示肿瘤的 MVD, 每张切片选取 5 个血管密度最高区域内的微血管, 共计数 4 张切片, 最后取平均数即为 MVD。

### 1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

肿瘤细胞凋亡的检测参照 TUNEL 凋亡试剂盒说明书进行。实验设 DNase I 为阳性对照, 不含 TdT 反应液的阴性对照。凋亡指数( apoptotic index, AI ) ( % ) = ( 凋亡细胞数/癌细胞总数 ) × 100%。

### 1.6 免疫荧光法检测荷瘤裸鼠缺氧以及血管构筑

治疗第 14 天处死荷瘤小鼠, 处死前裸鼠尾静脉注射 EF5, 以检测裸鼠肿瘤缺氧以及血管构筑。肿瘤组织冰冻切片( 50  $\mu$ m ), 分别用 Cy3 标记的 EF5 抗体和 CD31 单克隆抗体进行免疫荧光染色, 切片以苏木精衬染以显示组织坏死区域。肿瘤缺氧标记物 EF5 与其特异性抗体结合, 在激光共聚焦显微镜下用 480 nm 激发后呈红色, 血管标记物 CD31 在蓝光激发下呈绿色。

### 1.7 Western blotting 检测 VEGF 蛋白的表达

用组织匀浆法提取肿瘤组织蛋白, 将蛋白稀释

成终质量浓度为 1 μg/μl,行 12% SDS-PAGE 电泳,将产物转至 PVDF 膜上,室温封闭 2 h,加入兔抗人 VEGF( Santa Cruz, USA ),4 °C 反应过夜,PBS 洗膜,加入 1:2 000 羊抗兔 IgG/HRP,室温孵育 1 h,用化学发光试剂反应 5 min,最后显影。

1.8 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,各组均数间比较采用 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2.1 各种治疗对 9901 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

治疗第 4 天,EGFP 对照组、Avastin 治疗组和 *APE1* siRNA 组瘤体大小无区别( *P* > 0.05 ),而 Avastin + *APE1* siRNA 联合治疗组瘤体小于其他 3 组( *P* < 0.05 );治疗第 6 天后,Avastin 治疗组和 *APE1* siRNA 组瘤体较 EGFP 对照组缩小( *P* < 0.05 ),联合治疗组瘤体更明显小于其他 3 组( *P* < 0.01,图 1)。

计算抑瘤率结果显示,Avastin 组抑瘤率为 32.87%,*APE1* siRNA 组抑瘤率为 34.19%,联合治疗组抑瘤率为 75.5%。表明 *APE1* siRNA 和 Avastin 具有协同作用,能显著抑制骨肉瘤的生长( *P* < 0.01 )。

2.2 各种治疗对裸鼠移植骨肉瘤细胞 Ki67 表达、凋亡和微血管密度的影响

Avastin 治疗组、*APE1* siRNA 组和联合治疗组的 MVD、Ki67 表达及 AI 明显低于对照组( *P* < 0.01 ),而且联合治疗组 MVD、Ki67 表达及 AI 明显低于 Avastin 治疗组和 *APE1* siRNA 组( *P* < 0.01 ) (表 1,图 2、3)。

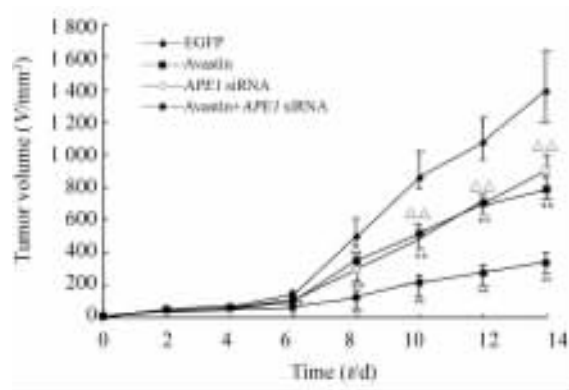


图 1 各种治疗对移植瘤生长的影响

Fig.1 Effects of different therapies on growth of implanted tumors

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs EGFP; Δ *P* < 0.05, ΔΔ *P* < 0.01 vs Avastin or *APE1* siRNA

表 1 各种治疗对移植瘤细胞增殖指数、凋亡指数和血管生成的影响

Tab.1 Effects of different therapies on Ki67 expression rate, apoptosis index ( AI ) and microvessel density ( MVD ) of implanted tumors

Group	n	MVD	Ki67 expression rate( % )	AI( % )
EGFP	4	26.36 ± 2.14	75.22 ± 4.66	2.44 ± 0.32
Avastin	4	14.32 ± 1.05**	48.24 ± 5.60**	7.54 ± 0.43**
<i>APE1</i> siRNA	4	15.44 ± 2.56**	54.28 ± 6.13**	6.54 ± 0.83**
Avastin + <i>APE1</i> siRNA	4	5.46 ± 1.54ΔΔ	25.40 ± 2.76ΔΔ	20.44 ± 3.21ΔΔ

ΔΔ *P* < 0.01 vs EGFP, Avastin or *APE1* siRNA; \*\* *P* < 0.01 vs EGFP

2.3 各种治疗对肿瘤组织缺氧和血管生成的影响

结果(图 4)发现,EGFP 对照组呈广泛弥漫的红色,但强度较低。*APE1* siRNA 组和 Avastin 治疗组呈弥漫的红色,部分坏死区域未见着色,坏死区域边缘其红染强度增加,其强度随离坏死距离的增大而减弱。联合治疗组红色区域呈局限性分布,强度明显增强。结果表明,靶向敲除 *APE1* 和注射 Avastin 后,导致肿瘤组织缺氧加重,血管生成减少,且两

者联合具有明显的协同作用。

2.4 各种治疗对移植瘤组织中 VEGF 表达的影响

Western blotting 检测结果(图 5)显示,*APE1* siRNA 和 Avastin 注射后 14 d 后,骨肉瘤组织中 VEGF 蛋白表达量较注射 EGFP 对照组显著降低,Avastin + *APE1* siRNA 联合注射后,肿瘤组织中 VEGF 降低更为明显,表明靶向敲除 *APE1* 可抑制骨肉瘤 VEGF 的表达,且与 Avastin 具有协同作用。

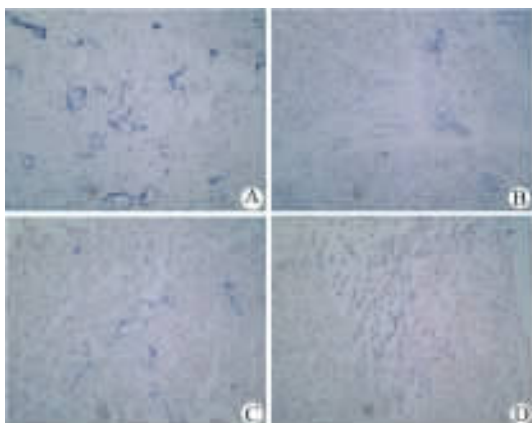


图 2 各种治疗对骨肉瘤细胞移植瘤组织微血管密度的影响 ( ×200 )

Fig.2 Effects of different therapies on microvessel density of implanted osteosarcoma tumors ( ×200 )

A: EGFP; B: Avastin; C: *APEI* siRNA; D: Avastin + *APEI* siRNA

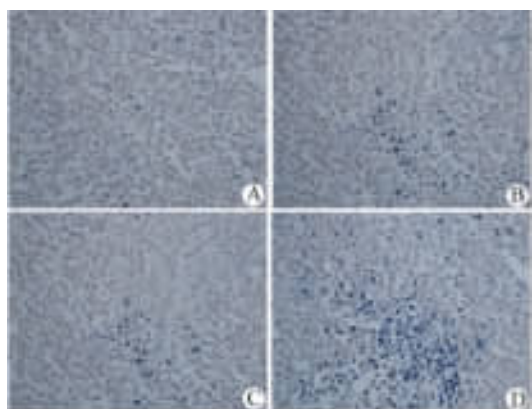


图 3 各种治疗对移植瘤细胞凋亡的影响 ( ×200 )

Fig.3 Effects of different therapies on apoptosis of implanted tumor cells ( ×200 )

A: EGFP; B: Avastin; C: *APEI* siRNA; D: Avastin + *APEI* siRNA

### 3 讨论

siRNA 具有强大的抑制基因表达的效应和高度的序列特异性。腺病毒载体是基因治疗中最常用的病毒载体,它具有包装容量较大、制备方便且易纯化和浓缩、宿主范围广、感染效率高、无 DNA 整合等特点,适用于恶性肿瘤基因治疗<sup>[9-10]</sup>。脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶是 DNA 损伤碱基切除修复( base excision repair, BER)途径的关键限速酶,具有修复 AP 位点和氧化还原双重功能,与细胞凋亡、肿瘤细胞的分化和转化、放化疗敏感性有着密切的关系<sup>[11-12]</sup>。以 APE 为靶点的基因治疗成为各种肿瘤治疗的新策略。本课题前期工作<sup>[10-12]</sup>发现,靶向敲除 *APEI*

可显著抑制直肠癌、骨肉瘤、肺癌和肝癌等多种恶性肿瘤的生长。本研究应用 *APEI* siRNA 特异性抑制 *APEI* 表达后,发现肿瘤生长被明显地抑制,且凋亡增加,血管生成减少。

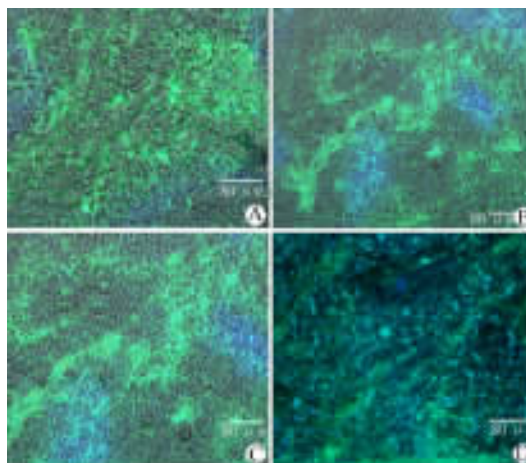


图 4 免疫荧光法检测骨肉瘤细胞移植瘤组织中 EF-5 和 CD31 蛋白的表达( 标尺为 80 μm )

Fig.4 EF-5 and CD31 protein expression in implanted osteosarcoma tumors as detected by immunofluorescence ( scale bar: 80 μm )

A: EGFP; B: Avastin; C: *APEI* siRNA; D: Avastin + *APEI* siRNA

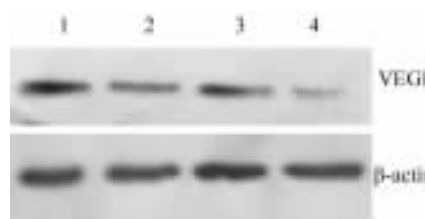


图 5 Western blotting 检测骨肉瘤移植细胞植瘤组织中 VEGF 蛋白的表达

Fig.5 VEGF expression in implanted osteosarcoma tumors as detected by Western blotting

1: EGFP; 2: Avastin; 3: *APEI* siRNA; 4: Avastin + *APEI* siRNA

Avastin 是人源化抗 VEGF 单抗,可抑制 VEGF 介导的肿瘤血管生成,以“饥饿”疗法促进肿瘤消亡,并减少肿瘤转移<sup>[13-14]</sup>。本研究表明,Avastin 抑制肿瘤内皮细胞的生长,导致肿瘤局部营养和血供不足,肿瘤细胞生长受到抑制并发生凋亡,进而出现大片坏死,和国外文献<sup>[15-16]</sup>报道相一致。

研究<sup>[5]</sup>发现,应用 siRNA 特异性地抑制骨肉瘤细胞 *APEI/Ref-1* 的表达,VEGF 的表达也显著降低,且骨肉瘤瘤体中血管新生明显受到抑制。这一抑制效应在时效和量效关系上与 *APEI* 表达降低平

行。一般认为 APE1/Ref-1 是通过 Ref-1 还原缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia induced factor, HIF-1 $\alpha$ ) 发挥作用的, 激活的 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 启动子低氧反应元件结合, 启动 VEGF 转录<sup>[17]</sup>。Breit 等<sup>[18]</sup> 发现在低氧或活性氧分子(ROS)的作用下, 由于 DNA 的损伤, VEGF 启动子会形成缺碱基(AP)位点, 而 APE1/Ref-1 可特异地与 AP 位点结合并形成单链断裂(single strand break, SSB), 后者可引起局部 DNA 的构象改变, 从而使 HIF-1 $\alpha$  能更有效地与启动子结合, 并促进 VEGF 转录。本研究也发现, 靶向干扰 APE1, 可抑制肿瘤血管的生成, 并下调 VEGF 的表达, 肿瘤缺氧加重。同时发现 APE1 siRNA 和抗血管生成治疗具有协同作用, 能显著抑制骨肉瘤血管的生成和加重肿瘤的缺氧。在缺氧状态下, APE1/Ref-1 通过氧化还原反应控制 HIF-1 $\alpha$  转录因子的活性, 同时缺氧诱导产生的 ROS 使 VEGF 启动子区易遭受氧化损伤而产生 AP 位点, 后者须由 APE1/Ref-1 进行修复。因此 APE1/Ref-1 不仅可通过 Ref-1 功能, 而且还可通过 APE1 的功能激活 VEGF, 在调控 VEGF 中处于核心地位。

APE1/Ref-1 对细胞存活至关重要<sup>[19-22]</sup>, 本研究提出的 APE1/Ref-1 对 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 调控的分子机制对肿瘤血管生成的调控可能具有普遍意义, 两者协同效应具有潜在临床应用价值。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] McNeill DR, Lam W, DeWeese TL, *et al.* Impairment of APE1 function enhances cellular sensitivity to clinically relevant alkylators and antimetabolites [ J ]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7( 6 ): 897-906.
- [ 2 ] Batuello CN, Kelley MR, Dynlacht JR. Role of Ape1 and base excision repair in the radioresponse and heat-radiosensitization of HeLa Cells [ J ]. *Anticancer Res*, 2009, 29( 4 ): 1319-1325.
- [ 3 ] Park WS, Ko EA, Jung ID, *et al.* APE1/Ref-1 promotes the effect of angiotensin II on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human endothelial cells via suppression of NADPH oxidase [ J ]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31( 10 ): 1291-1301.
- [ 4 ] Wang D, Zhong Z, Li M, *et al.* Vector-based Ape1 small interfering RNA enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to endostatin *in vivo* [ J ]. *Cancer Sci*, 2007, 98( 12 ): 1993-2001.
- [ 5 ] Cortés-Funes H. The role of antiangiogenesis therapy: Bevacizumab and beyond [ J ]. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11( 6 ): 349-355.
- [ 6 ] Gao Y, Mei J, Tong T, *et al.* Inhibitory effects of VEGF-siRNA mediated by adenovirus on osteosarcoma-bearing nude mice [ J ]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2009, 24( 2 ): 243-247.
- [ 7 ] Ziemer LS, Evans SM, Kachur AV, *et al.* Noninvasive imaging of tumor hypoxia in rats using the 2-nitroimidazole <sup>18</sup>F-EF5 [ J ]. *Eur J Nucl Med*, 2003, 30( 2 ): 259-266.
- [ 8 ] Sydney ME, Stephan MH, Deirdre PM, *et al.* Hypoxic heterogeneity in human tumors EF5 binding, vasculature, necrosis, and proliferation [ J ]. *Am J Clin Oncol*, 2001, 24( 5 ): 467-472.
- [ 9 ] Majhen D, Ambriovic-Ristov A. Adenoviral vectors-How to use them in cancer gene therapy [ J ]? *Virus Res*, 2006, 119( 2 ): 121-133.
- [ 10 ] Wang D, Xiang D, Yang X, *et al.* APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells [ J ]. *Lung Cancer*, 2009 [ Epub ahead of print ].
- [ 11 ] Kim MH, Kim HB, Acharya S, *et al.* Ape1/Ref-1 induces glial cell-derived neurotrophic factor ( GDNF ) responsiveness by upregulating GDNF receptor alpha1 expression [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29( 8 ): 2264-2277.
- [ 12 ] 卿毅, 王东, 仲召阳, 等. pSilence APE1 联合中子射线治疗骨肉瘤的体外实验研究 [ J ]. *解放军医学杂志*, 2007, 32( 7 ): 722-725.
- [ 13 ] Fernand NH, Hurwitz HI. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of colorectal cancer [ J ]. *Semin Oncol*, 2003, 30( 1 ): 39-50.
- [ 14 ] Wedam SB, Low JA. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2006, 24( 5 ): 769-777.
- [ 15 ] Zhang W, Qiu X, Chen B, *et al.* Antiangiogenic therapy with bevacizumab in recurrent malignant gliomas: analysis of the response and core pathway aberrations [ J ]. *Chin Med J( Engl )*, 2009, 122( 11 ): 1250-1254.
- [ 16 ] Furuya M, Yonemitsu Y, Aoki I. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment [ J ]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15( 16 ): 1854-1867.
- [ 17 ] Huang LE, Arany Z, Livingston DM, *et al.* Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit [ J ]. *J Biol Chem*, 1996, 271( 50 ): 32253-32259.
- [ 18 ] Breit JF, Ault-Ziel K, Al-Mehdi AB, *et al.* Nuclear protein induced bending and flexing of the hypoxic response element of the rat vascular endothelial growth factor promoter [ J ]. *FASEB J*, 2008, 22( 1 ): 19-29.
- [ 19 ] Sung JS, Demple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA [ J ]. *FEBS J*, 2006, 273( 8 ): 1620-1629.
- [ 20 ] Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1 [ J ]. *Mutat Res*, 2000, 461( 1 ): 83-108.
- [ 21 ] Demple B, Sung JS. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair [ J ]. *DNA Repair*, 2005, 4( 12 ): 1442-1449.

[ 收稿日期 ] 2009-05-25

[ 修回日期 ] 2009-06-19

[ 本文编辑 ] 徐红梅