

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.012

· 基础研究 ·

人血管能抑素抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长、转移及血管新生

陆卫忠¹, 肖飞¹, 黄桂君², 李玉英², 李瑾², 陈维中², 钱桂生² (1. 解放军 303 医院 呼吸内科, 广西南宁 530021; 2. 第三军医大学 新桥医院 全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

[摘要] 目的: 探讨人血管能抑素(canstatin) 对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长、转移和血管新生的影响。方法: 将 pCMV-Script/canstatin 及空载体 pCMV-Script 通过电穿孔的方法转染 A549 细胞, G418 筛选获得阳性克隆。RT-PCR 检测转染后细胞中 canstatin mRNA 的表达, Western blotting 检测转染后细胞中 canstatin 蛋白的表达。建立 Lewis 肺癌小鼠移植瘤模型, 观察 pCMV-Script/canstatin 组 A549 细胞培养上清对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的治疗作用, 免疫组化检测各治疗组荷瘤小鼠移植瘤的微血管密度。结果: pCMV-Script/canstatin 转染 A549 细胞在 G418 筛选后成功形成克隆, 转染的 A549 细胞能有效表达 canstatin mRNA 和蛋白。pCMV-Script/canstatin 治疗组小鼠肿瘤体积明显小于 pCMV-Script 组和 NS 组[(1.47 ± 0.21) cm³ vs (2.43 ± 0.15) cm³、(2.53 ± 0.18) cm³, *P* < 0.01]; pCMV-Script/canstatin 组、pCMV-Script 组和 NS 组的肺转移结节数分别为 (3.00 ± 1.00)、(7.80 ± 1.48)、(7.60 ± 2.41) 个, pCMV-Script/canstatin 组肿瘤转移受到显著的抑制 (*P* < 0.01); pCMV-Script/canstatin 组小鼠的肿瘤组织微血管数明显少于 pCMV-Script 组和 NS 组[(84.40 ± 8.83) vs (188.68 ± 11.15)、(190.24 ± 12.91) 个, *P* < 0.01]。结论: pCMV-Script/canstatin 能在 A549 细胞中表达并分泌至细胞外, canstatin 可明显抑制 Lewis 肺癌移植瘤的生长、转移和血管新生。

[关键词] 人血管能抑素; 转染; 血管生成; Lewis 肺癌

[中图分类号] R734.2; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0653-05

Canstatin inhibits growth, metastasis and angiogenesis of transplanted Lewis lung cancer in mice

LU Wei-zhong¹, XIAO Fei¹, HUANG Gui-jun², LI Yu-ying², LI Jin², CHENG Wei-zhong², QIAN Gui-sheng² (1. Department of Respiratory Disease, No 303 Hospital of PLA, Nanning 530021, Guangxi, China; 2. Institute of Respiratory Disease of PLA, Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of canstatin on growth, metastasis and angiogenesis of transplanted Lewis lung cancer in mice. **Methods:** The recombinant pCMV-Script/canstatin vector or the empty vector was transfected into A549 cells by electroporation, and the positive clones were screened with G418. The expressions of canstatin mRNA and protein in transfected A549 cells were examined by RT-PCR and Western blotting, respectively. Furthermore, transplanted Lewis lung cancer mouse model was established, and therapeutic effect of supernatant of pCMV-Script/canstatin transfected A549 cells on transplanted Lewis lung cancer was observed. Microvessel density of transplanted tumors in different therapy groups was observed by immunohistochemistry. **Results:** Positive clones of A549 cells transfected with pCMV-Script/canstatin were successfully obtained by G418 screening, and could effectively express canstatin mRNA and protein. The tumor size of the pCMV-Script/canstatin group (1.47 ± 0.21 cm³) was significantly smaller than that in the pCMV-Script group (2.43 ± 0.15 cm³) and NS group (2.53 ± 0.18 cm³) (*P* < 0.01). The number of pulmonary metastatic nodes was 3.00 ± 1.00, 7.80 ± 1.48 and 7.60 ± 2.41 respectively for pCMV-Script/canstatin, pCMV-Script and NS groups, so pCMV-Script/canstatin significantly inhibited metastasis of tumors (*P* < 0.01). The amount of microvessel count (MVC) in pCMV-Script/canstatin group was markedly decreased compared to that of pCMV-Script and NS groups (*P* < 0.01). **Conclusion:** The pCMV-Script/canstatin mediates expression of canstatin in A549 cells. Canstatin in A549

[作者简介] 陆卫忠(1968 -), 浙江省海盐市人, 硕士, 副主任医师, 副教授, 主要从事肺癌基础与临床研究方面的研究工作。E-mail: Lwz1968@tom.com

[通信作者] 钱桂生(Qian Gui-sheng, corresponding author), E-mail: gsqxhospital@yahoo.cn

supernatant has a strong inhibitory effect on growth, metastasis and angiogenesis of Lewis lung carcinoma.

[**Key words**] canstatin; transfection angiogenesis; ; Lewis lung carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 653-657]

血管生成对实体瘤的生长及转移非常重要, 阻断肿瘤的血管形成能抑制肿瘤的生长和转移^[1]。自 Folkman^[2] 提出肿瘤的“休眠疗法”(dormancy therapy) 以来, 已研发了大量的血管生成抑制剂。Canstatin 来自 IV 型胶原 $\alpha 2$ 链的 NC1 区^[3], 编码 227 个氨基酸残基, 相对分子质量约为 24 000。近期研究^[4]证实, canstatin 在体外可抑制内皮细胞的迁移和增殖, 并可以诱导其凋亡, 在体内可抑制肿瘤生长。本实验构建 canstatin 真核表达质粒, 采用电穿孔法将 canstatin 基因转染至肺癌 A549 细胞中, 观察 canstatin 基因在 A549 细胞培养上清中的表达及其对小鼠 Lewis 肺癌生长和转移的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和小鼠

pCMV-Script/canstatin 分泌型重组载体由本所构建^[4,5]。人肺癌 A549 细胞株由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所提供。Lewis 肺癌细胞株由新桥医院肿瘤科卓文磊博士赠送。电穿孔仪为美国 Bio-Rad 公司产品, G418 购于华美公司, Tri-pure 购自 Roche 公司, RT-PCR 试剂盒、DNA Marker 为鼎国公司产品。实验选取重庆医科大学实验动物中心的 4~6 周龄 C57BL/6 清洁级小鼠, 共 40 只, 体重(15 ± 2.2) g, 雌雄比例 1:1, 实验动物合格证号为 SCXK(渝)2007-0001。

1.2 稳定转染 pCMV-Script/canstatin 质粒 A549 细胞的筛选

实验分为 pCMV-Script/canstatin 转染组、pCMV-Script 转染组和生理盐水组。收集 A549 细胞, 用电穿孔缓冲液 0.5 ml 混悬细胞, 含细胞数约 1×10^7 /ml; 加至电穿孔杯中, 加入 pCMV-Script/canstatin 质粒或 pCMV-Script 10 μ g, 充分混匀, 电穿孔杯冰浴 10 min; 电击 1 次, 条件: 电压 500 V, 电容 25 μ F, 时间 1.9 s; 电穿孔杯冰浴 10 min, 加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。

培养 3 d 后用浓度为 500 mg/L 的 G418 筛选, 第 5 天时, 改用含 200 mg/L G418 的选择培养基培养。2 周后见有阳性克隆生长。同时, pCMV-Script 转染细胞作同样处理作为对照。

1.3 RT-PCR 检测细胞中 canstatin mRNA 的表达

引物设计: 上游引物 P1 为 5'-TCGAATTCATG-

GTCAGCATCGGCTACCTCCT-3'; 下游引物 P2 为 5'-GCAAGCTTTTCACAGGTTCTTCATGCACAC-3'。预计扩增产物长度为 703 bp。将各组 A549 细胞离心收集, 一步法抽提细胞总 RNA, RT-PCR 检测 canstatin mRNA 的表达。反应条件: 94℃ 变性 40 s, 60℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 60 s, 扩增 30 个循环, 最后 1 个循环 72℃ 延伸 10 min。各取 5 μ l PCR 产物, 加上样缓冲液后上样电泳。

1.4 Western blotting 检测转染后细胞中 canstatin 蛋白的表达

pCMV-Script/canstatin 和 pCMV-Script 质粒稳定转染 A549 细胞传代培养, 在细胞密度为 1×10^7 /ml 时, 留取培养上清; 再经 4℃、 $12\ 000 \times g$, 离心 20 min, 上清经冷冻干燥浓缩, 加生理盐水稀释后 -20℃ 保存备用。取各组少量上清液加含 DTT 的 SDS 样品缓冲液, 100℃ 5 min, 行 12% SDS-PAGE 电泳, 利用抗 canstatin 抗体检测转染后细胞中 canstatin 蛋白的表达。

1.5 pCMV-Script/canstatin 组 A549 细胞培养上清对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的治疗作用

Lewis 肺癌细胞培养后 $800 \times g$ 离心 10 min, 弃培养基。用 0.01 mol/L PBS 洗细胞 1 次, 重悬于 0.01 mol/L PBS 中, 以每只 3×10^6 细胞接种于 40 只小鼠右侧腹股沟皮下。Lewis 细胞接种后 3 周后肿瘤肉眼可见, 测量其长短径, 按公式 $V = a^2 \times b \times 0.52$ (a 为短径, b 为长径) 计算肿瘤体积。成瘤 36 只, 选取 30 只肿瘤大小相近的小鼠待其肿瘤长大至 1 cm^3 左右后, 随机分为 3 组。

治疗组每只腹股沟皮下注射 0.2 ml pCMV-Script/canstatin 组 A549 细胞培养上清; 对照组分别给予等量 pCMV-Script 组细胞培养上清和生理盐水, 连续 14 d。治疗期间隔天测量肿瘤长短径并计算肿瘤体积。治疗结束后, 断颈处死小鼠, 称取瘤重, 计数肺表面转移结节, 并进行肺及肿瘤组织病理学检查。

取 40 只 C57BL 小鼠, 同上法建立小鼠 Lewis 肺癌移植瘤模型, 成瘤 30 只, 随机分为 3 组, 分别给予 NS、pCMV-Script 转染 A549 细胞上清和 pCMV-Script/canstatin 转染 A549 细胞上清治疗, 自小鼠接种 Lewis 肺癌细胞开始计算小鼠生存时间, 治疗期间观察小鼠精神活动状态; 死亡时解剖观察局部浸润情况、腹水产生与否等。

1.6 免疫组化检测荷瘤小鼠肿瘤组织微血管记数

用抗小鼠 CD31 单克隆抗体标记肿瘤微血管,生物素标记的抗大鼠 IgG 为第二抗体, DAB 显色。在 200 倍镜下记数阳性细胞数个数,共 5 个视野,取平均值作为该小鼠肿瘤的微血管数目,每组 10 只取平均值作为该组的微血管数目,进行比较和分析。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计,组间差异采用单因素方差分析,组内差异比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 G418 筛选后 A549 细胞的阳性克隆结果

pCMV-Script/canstatin 转染 A549 细胞在 G418 筛选后形成克隆,与 pCMV-Script 转染组比较,pCMV-Script/canstatin 转染后细胞体积增大,胞内颗粒和空泡增加,细胞为梭形或不规则形(图 1)。

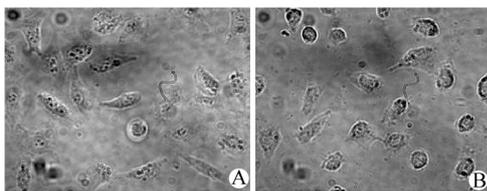


图 1 稳定转染 pCMV-Script/canstatin 载体的 A549 细胞克隆 (×400)

Fig.1 A549 cells stably transfected with pCMV-Script/canstatin (×400)

A: pCMV-Script/canstatin; B: pCMV-Script

2.2 pCMV-Script/canstatin 转染后 A549 细胞中 canstatin mRNA 和蛋白的表达

pCMV-Script/canstatin 转染的 A549 细胞可检测到 canstatin mRNA 和蛋白的表达,而 pCMV-Script 转染 A549 细胞未能检测到 canstatin mRNA 和蛋白的表达(图 2)。由此提示,只有 pCMV-Script/canstatin 转染的 A549 细胞才表达 canstatin mRNA 和蛋白。

2.3 pCMV-Script/canstatin 转染后 A549 细胞上清抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长和转移

小鼠 Lewis 肺癌皮下移植瘤形成瘤结节,呈卵圆形,有分叶,治疗前各组移植瘤大小相仿。治疗后,pCMV-Script 组和生理盐水组小鼠移植瘤仍不断增大,瘤体质硬,表面包膜破坏并侵犯周围组织。pCMV-Script/canstatin 组小鼠移植瘤结节生长缓慢,瘤体质软,表面光滑,覆盖有完整的灰白色包膜。治疗第 6 天始,pCMV-Script 组和生理盐水组小鼠肿瘤

增大明显,而 pCMV-Script/canstatin 组小鼠肿瘤呈缓慢增长,治疗结束后 pCMV-Script/canstatin 组肿瘤体积和瘤重明显小于 pCMV-Script 转染组和生理盐水组 ($P < 0.01$,表 1)。

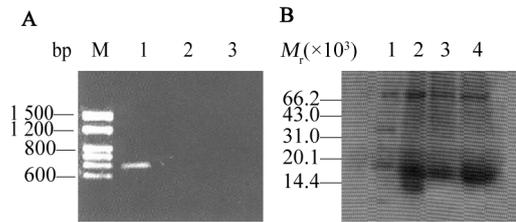


图 2 pCMV-Script/canstatin 转染后 A549 细胞中 canstatin mRNA (A) 和蛋白 (B) 的表达

Fig. 2 Expression of canstatin mRNA (A) and protein (B) in A549 cells after pCMV-Script/canstatin transfection

M: DNA Marker; 1: pCMV-Script/canstatin transfected A549 cells; 2: pCMV-Script transfected A549 cells; 3: Untransfected A549 cells

pCMV-Script 转染组和生理盐水组小鼠体重开始时有轻微增加,治疗中后期其体重反而有所下降,治疗结束后小鼠体重明显轻于 pCMV-Script/canstatin 组 ($P < 0.01$,表 1)。小鼠肺表面转移结节呈微小白色颗粒状,pCMV-Script/canstatin 组肺转移结节数明显少于 pCMV-Script 组和生理盐水组 ($P < 0.01$)。

2.4 pCMV-Script/canstatin 转染 A549 细胞上清抑制移植瘤血管的生成

不同治疗组移植瘤形态大致相同,细胞浸润生长,部分区域呈不典型的腺样结构或乳头状结构。原位肿瘤病理切片 (H-E 染色) 显示:治疗组可见大片状坏死,肿瘤排列紊乱,其间少见血管;而对照组肿瘤排列相对整齐,其间可见有较丰富的血管,坏死面积少(图 3)。肺脏病理切片见 pCMV-Script 转染组和生理盐水组小鼠肺表面有较多散在转移灶,转移结节较大,其中有新生血管,且以肺周边部为主;而治疗组肺转移结节小,少见肿瘤血管。

肿瘤组织微血管记数结果可见,pCMV-Script/canstatin 转染 A549 细胞培养上清治疗组的移植瘤微血管记数明显少于 pCMV-Script 转染组和 NS 组 [(84.40 ± 8.83) vs (188.68 ± 11.15) 、 (190.24 ± 12.91)], $P < 0.01$,图 4]。因此,pCMV-Script/canstatin 治疗组的小鼠肿瘤血管生成受到明显抑制。

2.5 各组荷瘤小鼠生存时间、局部浸润及一般情况的观察

在治疗的整个过程中,pCMV-Script/canstatin 组

小鼠活动良好, 精神状态佳, 反应灵敏, 能正常摄食, 除肿瘤坏死部位有脱毛外, 未见其他不良反应。pCMV-Script组和 NS 组小鼠在接种 1 周起, 即出现摄食、活动减少, 消瘦、精神状态差及反应迟钝。pCMV-Script/canstatin 组生存时间[(52. 80 ± 8. 84) d]明显长于 pCMV-Script 组[(42. 22 ± 3. 77) d]和

NS 组[(41. 11 ± 4. 31) d, $P < 0. 01$]。荷瘤小鼠死亡后, 解剖发现 pCMV-Script 组及 NS 组肿瘤表面包膜破坏并侵犯周围组织, 13 只出现向局部肌肉、骨骼浸润, 出现腹水 8 只; 而 pCMV-Script/canstatin 组肿瘤包膜完整, 局部浸润不明显。

表 1 各组小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长和转移情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Growth and metastasis of mouse Lewis lung carcinoma in each therapy groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Before treatment		After treatment		Tumor weight (g)	Number of pulmonary metastatic node
	Tumor size (cm^3)	Mouse weight (g)	Tumor size (cm^3)	Mouse weight (g)		
NS	1. 01 ± 0. 09	14. 38 ± 0. 88	2. 53 ± 0. 18	14. 04 ± 0. 66	2. 81 ± 0. 15	7. 60 ± 2. 41
pCMV-Script	1. 04 ± 0. 10	14. 51 ± 0. 62	2. 43 ± 0. 15	13. 26 ± 0. 69	2. 72 ± 0. 32	7. 80 ± 1. 48
pCMV-Script/canstatin	1. 06 ± 0. 06	14. 11 ± 0. 74	1. 47 ± 0. 21 ^{**} _{△△}	17. 13 ± 1. 08 ^{**} _{△△}	1. 17 ± 0. 12 ^{**} _{△△}	3. 00 ± 1. 00 ^{**} _{△△}

** $P < 0. 01$ vs NS; ^{△△} $P < 0. 01$ vs pCMV-Script group

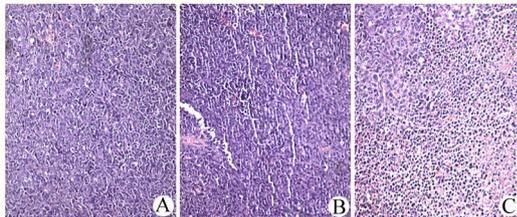


图 3 不同治疗组小鼠移植瘤组织病理学变化(H-E, ×200)

Fig. 3 Pathological changes of transplanted tumor tissues in different therapy groups(H-E, ×200)

A: NS; B: pCMV-Script; C: pCMV-Script/canstatin

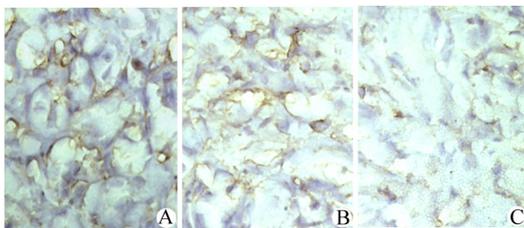


图 4 免疫组化检测不同治疗组小鼠移植瘤的微血管计数(×400)

Fig. 4 Microvessel counts of transplanted tumor tissues in different therapy groups as detected by immunohistochemistry(×400)

A: NS; B: pCMV-Script; C: pCMV-Script/canstatin

3 讨论

近年来血管内皮细胞已成为肿瘤研究领域的一

个热点。大量研究^[5-8]证实, 抑制肿瘤血管内皮细胞生长可抑制肿瘤血管生成和肿瘤生长。O'Reilly^[9]等用内皮抑素治疗 Lewis 肺癌小鼠, 可使原发肿瘤直径缩小 150 倍, 而对正常细胞无毒性亦无耐药性产生。Canstatin 与内皮抑素同为胶原来源的内源性血管生成抑制剂, 实验^[10]表明, canstatin 的 ED₅₀ 是内皮抑素的 1/3, 因此, canstatin 抗血管生成应更强^[11]。前期实验^[12-13]证明, cansatin 对肺癌 A549 细胞、人淋巴细胞无直接的生长抑制作用, 而只对新生内皮细胞有专一抑制作用。

Kamphaus^[10]发现, canstatin 重组蛋白可以剂量依赖性地抑制内皮细胞管状结构形成。canstatin 对牛肺动脉内皮细胞和人脐静脉内皮细胞增殖均具有抑制作用, 当 canstatin 剂量达到 10 ng/ml 时, 对人脐静脉内皮细胞迁移亦有明显抑制效果。而对于肾母细胞、前列腺癌细胞和人胚肾细胞, canstatin 直到剂量为 40 μg/ml 时仍未见抑制作用, 说明 canstatin 的抗肿瘤作用是通过抑制肿瘤血管生成实现的。

本实验发现, 接受 pCMV-Script/canstatin 转染的 A549 细胞培养上清治疗后, 小鼠肿瘤组织出现大片坏死, 血管密度减小; 而 pCMV-Script 组和生理盐水组小鼠肿瘤增长良好, 肿瘤中心部位小片坏死, 组织血管密度高。其原因可能是 canstatin 使小鼠新生血管生成出现障碍, 导致肿瘤出现坏死。本研究进一步检测肿瘤组织的微血管密度, 发现 pCMV-Script/canstatin 治疗组肿瘤微血管密度明显少于 pCMV-Script 组和生理盐水组, 说明 canstatin 蛋白可

抑制肿瘤内血管的形成。Canstatin 抑制血管生成的机制在于其能抑制整联蛋白/FAK 信号转导通路和 PI3K/Akt 信号通路^[14]。此通路对血管内皮细胞的分化、迁移是必需的。FAK 直接作用于 PI3K p85 调节亚基的 SH2 与 SH3 区域,从而激活 Akt。激活的 Akt 可磷酸化它的下游分子,从而抑制细胞凋亡。PI3K/Akt 信号转导的抑制可加强血管内皮细胞 Fas 介导的细胞凋亡^[15]。研究^[14]表明,canstatin 诱导的细胞凋亡与 PI3K/Akt 抑制作用有关,依赖通过膜凋亡受体进行信号转导。抗凋亡蛋白 FLIP 的表达主要决定于 PI3K/Akt 信号通路的活性。canstatin 通过抑制 Akt 与 FAK 的磷酸化,阻断 PI3K/Akt 信号通路,从而引起 FLIP 的下调。Fas 作为凋亡受体,血管能抑素可诱导 Fas 与 Fas 配体的表达,通过 Fas 依赖的细胞通路,诱导内皮细胞凋亡。

本实验用 pCMV-Script/canstatin 重组载体转染的 A549 细胞上清治疗荷瘤小鼠后,移植瘤生长明显减缓,并伴有小鼠体重的增加;而 pCMV-Script 治疗组和生理盐水组小鼠移植瘤体积不断增大,小鼠体重反而有所下降,可能是肿瘤消耗了机体的营养,再加上食入不足,造成了小鼠的恶病质。实验结束后称取瘤重发现,pCMV-Script/canstatin 组瘤重明显小于 pCMV-Script 组和生理盐水组,且 pCMV-Script/canstatin 组小鼠生存时间明显长于 pCMV-Script 治疗组和生理盐水组,提示 canstatin 能通过“饥饿疗法”抑制肿瘤生长。

血管形成与肺癌的侵袭和转移密切相关,而且,原发肿瘤及其转移病灶也需要新的血管形成来维持生长,因此,在肿瘤发展的各个阶段都伴随着血管形成^[17-18]。本实验中 pCMV-Script/canstatin 治疗组的 Lewis 肺癌肺部转移结节明显少于 pCMV-Script 组和生理盐水组,说明 canstatin 可以通过抑制血管形成而减少肿瘤的转移机率。总之,本研究说明 canstatin 在体外虽对 A549 细胞无抑制作用,在体内可以通过抑制肿瘤血管新生从而抑制肿瘤生长和转移。

[参考文献]

- [1] O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(8): 1427-1432.
- [2] Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications [J]. *N*

Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.

- [3] Mundel TM, Kalluri R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors [J]. *Microvasc Res*, 2007, 74(2/3): 85-89.
- [4] 李玉英, 钱桂生, 黄桂君, 等. Canstatin 基因表达载体的构建及其生物学效应研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(19): 1723-1725.
- [5] 李玉英, 钱桂生, 黄桂君, 等. 血管能抑素重组基因表达载体抗肺癌效应研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 1(4): 257-262.
- [6] Zhang X, Song Y, Wu Y, et al. Indirubin inhibits tumor growth by antitumor angiogenesis via blocking VEGFR2-mediated JAK/STAT3 signaling in endothelial cell [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(10): 2502-2511.
- [7] Cantelmo AR, Cammarota R, Noonan DM, et al. Cell delivery of Met docking site peptides inhibit angiogenesis and vascular tumor growth [J]. *Oncogene*, 2010, 29(38): 5286-5298.
- [8] 刘丽华, 单保恩, 王士杰, 等. IL-27 通过上调 MIG 和 IP-10 的表达抑制肿瘤血管形成 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(1): 40-44.
- [9] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.
- [10] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 1209-1215.
- [11] Frau E, Magnon C, Opolon P, et al. A gene transfer comparative study of HSA-conjugated antiangiogenic factors in a transgenic mouse model of metastatic ocular cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(3): 251-261.
- [12] 陆卫忠, 黄桂君, 钱桂生, 等. Canstatin 基因转染对肺癌 A549 细胞和血管内皮细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中国肺癌杂志*, 2005, 8(2): 95-98.
- [13] 陆卫忠, 王细文, 黄桂君, 等. 血管能抑素在淋巴细胞中的表达及其抗肺癌作用的实验研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2006, 9(3): 245-249.
- [14] Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37632-37636.
- [15] Suhara T, Mano T, Oliveira BE, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP) [J]. *Circ Res*, 2001, 89(1): 13-19.
- [16] Böhle AS, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 1999, 384(2): 133-140.
- [17] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis [J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.

[收稿日期] 2011 - 08 - 05

[修回日期] 2011 - 09 - 22

[本文编辑] 王莹