

重组人血管内皮抑素间插联合顺铂对 H22 小鼠腹水瘤抑制作用的研究*

266042 山东青岛 青岛市中心医院肿瘤综合治疗科

魏红梅, 秦叔逵^{1,2}, 殷晓进³, 陈亚利³, 华海清¹, 王琳¹, 杨宁蓉¹, 陈映霞¹, 刘秀峰¹

【摘要】目的 观察重组人血管内皮抑制素(恩度)间插联合顺铂腹腔内注射治疗小鼠腹水瘤的疗效和安全性。**方法** 采用肝细胞癌 H22 腹水瘤细胞株建立小鼠腹水瘤模型。120 只造模后的 ICR 小鼠随机分为 4 组:对照组(生理盐水 d₁~d₁₀)、恩度组(恩度 8mg/kg, d₁~d₅, d₇~d₁₀, 生理盐水 d₆)、顺铂组(顺铂 0.04mg/kg, d₆, 生理盐水 d₁~d₅, d₇~d₁₀)及恩度联合顺铂组(恩度 8mg/kg, d₁~d₅, d₇~d₁₀; 顺铂 0.04mg/kg, d₆), 每组 30 只, 每只小鼠腹腔注射的药物体积均为 0.2ml。记录各组小鼠腹水体积、腹水中肿瘤细胞、红细胞计数以及生存期;观察各组荷瘤小鼠腹膜和腹腔脏器种植转移情况;检测各组小鼠的腹膜渗透性、血常规和肝肾功能;流式细胞仪检测各组小鼠腹腔积液中肿瘤细胞凋亡情况。**结果** 与对照组相比,恩度组和顺铂组和恩度联合顺铂组均能减少荷瘤小鼠腹腔积液的体积、肿瘤细胞数和红细胞数,延长荷瘤小鼠的生存时间。在上述指标中,恩度联合顺铂组与恩度组和顺铂组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。恩度联合顺铂组小鼠腹腔积液中肿瘤细胞的凋亡率显著高于恩度组和对照组($P < 0.05$),但与顺铂组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);恩度联合顺铂组小鼠的腹膜渗透性明显低于顺铂组和对照组($P < 0.05$),但恩度联合顺铂组与恩度组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。恩度联合顺铂组小鼠的体重增加及腹腔种植转移均少于其他 3 组。各组小鼠均未出现血常规和肝肾功能明显异常。**结论** 恩度间插联合顺铂腹腔内应用治疗小鼠 H22 腹水瘤疗效显著,安全性好。

【关键词】 重组人血管内皮抑素; 顺铂; 腹水瘤; 腹膜渗透性; 凋亡

中图分类号:R73-36 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)02-0122-06

Research on intercalated combination of recombinant human endostatin and cisplatin in H22 tumor ascite model

WEI Hongmei, QIN Shukui, YIN Xiaojin, CHEN Yali, HUA Haiqing, WANG Lin, YANG Ningrong, CHEN Yingxia, LIU Xiufeng. Department of Oncology, Qingdao Central Hospital, Qingdao 266042, China

Corresponding author: QIN Shukui, E-mail: qinsk@csc.org.cn

【Abstract】 Objective To observe the effects and safety of intercalated combination of recombinant human endostatin (endostar) and cisplatin by intraperitoneal injection in mice model bearing tumor ascite. **Methods** The tumor ascites model were established with hepatocellular carcinoma H22 cell lines by intraperitoneal injection. One hundred and twenty ICR mice were randomly assigned into 4 groups: control group (normal saline d₁-d₁₀), endostar group (endostar 8mg/kg, d₁-d₅, d₇-d₁₀; normal saline d₆), cisplatin group (cisplatin 0.04mg/kg, d₆; normal saline d₁-d₅, d₇-d₁₀) and combined group (endostar 8mg/kg, d₁-d₅, d₇-d₁₀; cisplatin 0.04mg/kg, d₆). Body weight, volume of ascites, the number of tumor cells and red cells were measured. The peritoneum permeability assay, blood routine, liver function and renal function were tested in each group respectively. Implantation metastasis of tumor was observed in abdominal cavity of mice. Apoptosis of tumor cells in the ascites fluid were detected by flow cytometry. Survival time of each mouse was recorded. **Results** Compared with the control group, endostar group, cisplatin group and combined group could inhibit ascites accumulation, reduce the counts of tumor cells and red cells in the ascites fluid and tumor burden of abdominal cavity, as well as prolonging survival of mice ($P < 0.05$). In those above items, combined group showed statistic significance compared with endostar group and cisplatin group ($P < 0.05$). Combined group significantly increased apoptosis of tumor cells compared with control group and endostar group ($P < 0.05$), but showed no difference with cisplatin group ($P > 0.05$). Combined group obviously inhibited the

* 基金项目:中国博士后科学基金面上资助项目(20090451574);江苏省博士后基金资助项目(820901063C)

1 210002 解放军八一医院全军肿瘤中心肿瘤内科

2 通讯作者, E-mail: qinsk@csc.org.cn

3 210042 江苏先声药业有限公司研究院

peritoneum permeability compared with control group and cisplatin group ($P < 0.05$), but showed no difference with endostar group ($P > 0.05$). Peritoneal metastasis and weight gain were less in combined group compared with the other 3 groups. Blood routine, liver function and renal function of the each group were normal. **Conclusion** The intercalated combination of endostar and cisplatin by intraperitoneal injection treating H22 mice bearing tumor ascite has ideal effect and safety.

【Key Words】 Recombinant human endostatin; Cisplatin; Tumor ascite; Peritoneum permeability; Apoptosis

既往实验研究已经证实,重组人血管内皮抑素恩度单药具有抑制荷瘤小鼠腹腔积液生成的作用^[1-2]。研究表明,血管内皮抑素与化疗、放疗等联合使用具有协同效应^[3-5]。这种治疗模式突破了恩度单药治疗有效率不高的临床研究困境。本研究为了观察恩度间插联合顺铂治疗荷瘤鼠恶性腹腔积液的疗效,为临床上恩度与顺铂如何优化组合治疗恶性腹腔积液提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂 小鼠肝细胞癌 H22 腹水瘤细胞均由中国科学院上海细胞所提供(美国 ATCC 公司产品), Real time-PCR 检测为血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达的细胞株, Western blotting 检测细胞能够稳定表达 VEGF 蛋白,腹腔接种具有使 ICR 小鼠产生腹腔积液的能力。H22 腹水瘤细胞由江苏先声药物研究有限公司细胞实验室传代保存。ICR 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,6 周龄,体重 18~20g,雌性,饲养于 SPF 级环境中,动物编号:SCXK(沪)2007-0005。恩度原液由先声药物研究有限公司提供(9.7mg/ml,批号:YY2009005),顺铂注射液购自齐鲁制药有限公司(批号:8090162DB),伊文思蓝(Evans Blue)购自美国 Sigma 公司,RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠腹腔积液瘤模型的建立 将 H22 细胞快速解冻复苏,用 RPMI 1640 培养液(含 10% 胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml)置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,取对数生长期的细胞用不含血清的 RPMI 1640 培养液稀释,制成单细胞悬液,用 0.4% 台盼蓝染色计数活细胞数 > 98%。取细胞悬液注射于 3 只 ICR 小鼠腹腔(2×10^6 /只),将接种 8 d 的 ICR 小鼠在超净工作台无菌抽取腹水,用不含血清的 RPMI 1640 培养液稀释悬浮肿瘤细胞并调整细胞浓度,按 0.2ml/只(细胞数约 1.5×10^6 /只)接种于 120 只小鼠腹腔内。

1.2.2 实验分组和给药方法 小鼠造模后随机分为 4 组:对照组(生理盐水 $d_1 \sim d_{10}$)、恩度组(恩度 8mg/kg, $d_1 \sim d_5, d_7 \sim d_{10}$, 生理盐水 d_6)、顺铂组(顺铂 0.04mg/kg, d_6 , 生理盐水 $d_1 \sim d_5, d_7 \sim d_{10}$)和恩度联合顺铂组(恩度 8mg/kg, $d_1 \sim d_5, d_7 \sim d_{10}$; 顺铂 0.04mg/kg, d_6),每组小鼠 30 只,其中 16 只用于观察生存状况和生存期,剩余 14 只用于检测相关指标。用生理盐水调整恩度和顺铂的浓度,每只小鼠每天腹腔注射液体体积均为 0.2ml。治疗结束 24h 以颈椎脱位法处死各组 14 只小鼠,留取标本(肿瘤细胞、腹腔积液上清等),均保存在 -80℃ 冰箱中,进行相关指标检测。

1.3 观测指标和检测方法

1.3.1 荷瘤小鼠体重 观察各组荷瘤小鼠饮食、精神状态和体型的变化,隔日监测各组荷瘤小鼠体重并记录,绘制荷瘤小鼠体重变化曲线。

1.3.2 荷瘤小鼠腹腔积液体积 颈椎脱位法处死每组 6 只荷瘤小鼠,无菌条件下开腹,用无菌吸管收集腹腔积液入离心管,计算腹腔积液平均体积。

1.3.3 荷瘤小鼠腹腔积液中肿瘤细胞数、红细胞数 取上述腹腔积液(每只小鼠 1ml)标本置于含肝素的干试管内,用生理盐水稀释 100 倍;取稀释液 1ml,用白细胞计数法计算肿瘤细胞数和红细胞总数。

1.3.4 荷瘤小鼠腹腔积液中肿瘤细胞凋亡检测 分别收集上述各组小鼠腹腔积液 5ml, 2000r/min 离心 5min,弃上清并收集腹腔积液肿瘤细胞(并用红细胞裂解液处理腹腔积液中的红细胞);用 PBS 洗涤细胞 2 次(2000r/min 离心 5min),收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞;加入 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ l Propidium Iodide,混匀;室温、避光、反应 5~15min;加入 400 μ l 缓冲液混合,在 1h 内用流式细胞仪检测,激发波长 Ex = 488nm,发射波长 Em = 530nm。Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道 FL1 检测,PI 红色荧光通过 PI 通道 FL3 检测。荧光补偿调节:使用未经凋亡诱导处理的肿瘤细胞,作为对照进行荧光补偿调

节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

1.3.5 腹膜渗透性检测 最后一次给药后 24h, 每组取剩余的 8 只小鼠进行腹膜渗透性检测。从小鼠尾静脉缓慢注射 0.2ml 2% 的伊文思蓝 (2g/L), 2h 后处死小鼠, 收集腹水。将腹水离心后取上层腹水, 用酶标仪检测 540nm 波长处伊文思蓝的吸光值 (A), 通过 A 值间接反映伊文思蓝的浓度, 从而分析小鼠的腹膜渗透性。

1.3.6 各组荷瘤小鼠的生存时间 记录各组剩余 16 只荷瘤鼠的生存时间并计算生命延长率, 按下列公式计算: 生命延长率 = $(T/C-1) \times 100\%$, T 为治疗组平均生存天数, C 为对照组平均生存天数。

1.3.7 安全性观察 最后一次给药后 24h, 收集各组 14 只小鼠的血液, 检测血常规和肝肾功能。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件处理数据。数据以均数 \pm 标准差表示, 多组比较采用单因素方差分析, 方差齐性的组间多重比较采用 LSD 法, 方差不齐的组间多重比较采用 Games-Howell 法; 两组比较采用独立样本 *t* 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组荷瘤小鼠的一般生活状况 接种后第 7d, 对照组荷瘤小鼠体重迅速增加, 逐渐出现精神萎靡不振、进水进食减少, 毛发粗糙少光泽, 晚期腹部极度膨隆, 呈恶液质状态, 荷瘤小鼠于接种第 11d 开始出现死亡。相对于对照组, 各治疗组荷瘤小鼠体重增加较缓慢, 以恩度联合顺铂组最明显。各组小鼠的血常规和肝肾功能未发现明显异常, 亦未观察到小鼠突然死亡。见图 1。

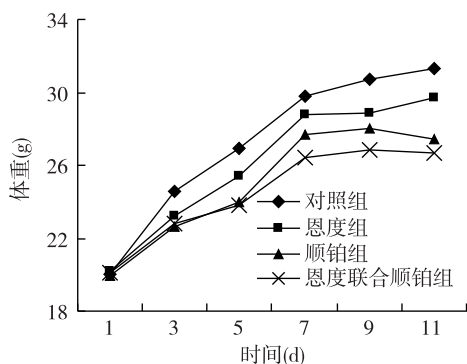


图 1 各组荷瘤小鼠的体重变化曲线

2.2 各组荷瘤小鼠腹腔积液的生成情况 对照组、恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组荷瘤小鼠腹腔积

液体积 (ml) 分别为 10.9 ± 1.3 、 7.2 ± 1.1 、 6.3 ± 1.0 和 4.5 ± 0.5 , 恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$); 恩度联合顺铂组与恩度组或顺铂组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$, $P = 0.007$)。

2.3 各组荷瘤小鼠腹腔积液中红细胞和肿瘤细胞的情况 荷瘤小鼠腹腔积液中肿瘤细胞和红细胞均在 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 以上。对照组、恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组腹腔积液中红细胞数 ($10^7/\text{ml}$) 分别为 23.2 ± 5.0 、 17.3 ± 5.3 、 13.5 ± 5.0 和 7.8 ± 3.1 , 恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P = 0.040$, $P = 0.002$, $P < 0.001$); 恩度联合顺铂组与恩度组或顺铂组比较, 差异均有统计学意义 ($P = 0.002$, $P = 0.049$); 恩度组和顺铂组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.175$)。

对照组、恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组腹腔积液中肿瘤细胞数 (10^7 个/ml) 分别为 22.4 ± 5.7 、 15.1 ± 3.6 、 12.4 ± 2.9 和 7.2 ± 1.9 , 恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P = 0.004$, $P < 0.001$, $P < 0.001$); 恩度联合顺铂组与恩度组或顺铂组比较, 差异均有统计学意义 ($P = 0.003$, $P = 0.038$); 恩度组与顺铂组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.242$)。

2.4 各组荷瘤小鼠腹腔积液中肿瘤细胞的凋亡情况 对照组、恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组荷瘤小鼠腹腔积液肿瘤细胞的凋亡率 (%) 分别为 9.7 ± 2.1 、 8.2 ± 3.0 、 58.9 ± 4.2 和 62.3 ± 5.6 。恩度组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 恩度联合顺铂组和顺铂组分别与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 恩度联合顺铂组与顺铂组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组荷瘤小鼠的腹膜渗透性 对照组、恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组荷瘤小鼠的 A 值分别为 3.27 ± 0.24 、 2.65 ± 0.13 、 3.44 ± 0.27 和 2.54 ± 0.12 , 恩度组和恩度联合顺铂组与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$); 顺铂组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.157$); 恩度联合顺铂组与恩度组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.345$); 恩度组与顺铂组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.6 各组荷瘤小鼠腹膜和腹腔脏器的种植转移情况 每组解剖 6 只荷瘤小鼠, 对照组荷瘤小鼠全部出现腹腔内结节, 部分侵犯肾、肠等部位, 恩度联合

顺铂组、恩度组和顺铂组对荷瘤小鼠远处转移抑制作用明显好于对照组,以恩度联合顺铂组作用最明显。见表 2。

表 2 各组 H22 荷瘤小鼠腹腔转移情况

组别	腹腔积液生成率(%)	瘤结节形成率(%)	转移结节数(个)	最大结节直径(cm)	转移部位
对照组	100	100(10/10)	32	2.8	胃周、肠系膜、输尿管
恩度组	100	60(6/10)	22	1.6	胃周、肠系膜
顺铂组	100	50(5/10)	16	1.5	胃周、肠系膜
恩度联合顺铂组	80	40(5/10)	10	0.6	胃周、肠系膜

2.7 各组荷瘤小鼠的生存情况 对照组、恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组荷瘤小鼠的生存期(天)分别为 12.4 ± 1.2 、 16.2 ± 1.9 、 18.2 ± 2.0 和 22.0 ± 1.9 ,恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.001$);恩度联合顺铂组与恩度组或顺铂组比较,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。恩度组、顺铂组和恩度联合顺铂组荷瘤小鼠的生存时间延长率分别为 30.6%、46.8% 和 77.4%。见图 2。

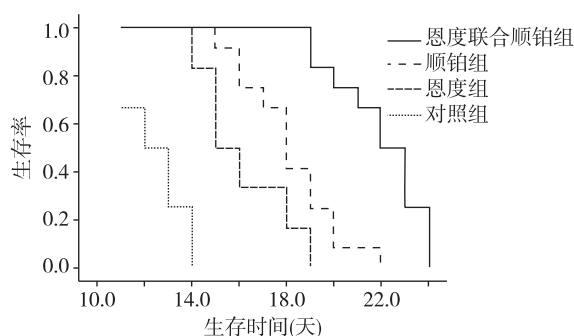


图 2 各组 H22 荷瘤小鼠的生存情况

3 讨论

恶性腹腔积液是晚期或复发恶性肿瘤常见并发症,以胃肠道来源的恶性腹腔积液预后最差^[6],临床上处理这部分患者是个难题。目前恶性腹腔积液的治疗手段均缺乏高级别的循证医学依据^[6],并因反复给药引起腹膜刺激、肠粘连、肠梗阻、包裹性积液等,影响患者的生活质量并缩短生存期。因此寻找新的药物和治疗策略,使患者获得较好的生存受益,具有科学意义和重要的实用价值。

1971 年 Folkman 教授首先提出恶性肿瘤生长和转移依赖于肿瘤新生血管的新观点,由此开创了

肿瘤血管生成和抗肿瘤治疗的研究^[8]。1997 年 Folkman 实验室 O'Reilly 等^[9]从小鼠的成血管细胞瘤株培养液中分离提纯了血管内皮抑素,研究表明,血管内皮抑素能直接抑制新生血管内皮细胞增殖、迁移、分化,促进内皮细胞凋亡,并抵抗 VEGF 的促新生血管生成和增加血管渗透性作用,另外还可以调节肿瘤细胞表面 VEGF 的表达和蛋白水解酶的活性,多靶点发挥抗肿瘤血管生成的作用^[10-11]。恩度在血管内皮抑素的氨基末端增加了 9 个氨基酸序列,其稳定性提高,生物活性增加。研究表明,恩度能提高多种恶性肿瘤化疗的效果。Rong 等^[12]系统回顾了 15 项恩度联合铂类双药方案治疗非小细胞肺癌临床研究,结果显示联合方案能显著提高患者的有效率、疾病控制率、疾病进展时间,并能改善患者的生活质量。王金万等^[13-14]报道恩度联合 NP 方案治疗非小细胞肺癌的 III、IV 期临床试验,均证实恩度联合 NP 方案能够明显延长晚期肺癌患者的无进展生存期和总生存期。可见,血管生成抑制剂与化疗联合可增强抗肿瘤作用,这种治疗模式突破了血管生成抑制剂单药治疗有效率不高的瓶颈,目前血管生成抑制剂与化疗联合使用的理念已在临床实践中形成共识。

肿瘤新生血管生成和血管渗透性增高在恶性浆膜腔积液的生成中起重要作用,故应用抗肿瘤血管生成治疗也成为治疗恶性腹腔积液的一项尝试。抗肿瘤血管生成药物贝伐珠单抗、Albendazole 等单药或联合化疗药物治疗恶性腹腔积液在动物模型和临床上均显示较好的疗效^[7,15],但尚无大样本的随机对照的临床研究。根据恩度的作用机制及先前的基础和临床观察,恩度联合化疗药物腔内给药治疗恶性浆膜腔积液会有好的疗效。

众所周知,化疗药物是以靶向肿瘤细胞发挥细胞毒性作用为主,抗肿瘤血管生成治疗主要以内皮

细胞为治疗靶点。不论是在原位肿瘤病灶的增长还是在转移灶的形成过程中,肿瘤血管新生都起着重要的作用。传统观点认为细胞毒药物需进入肿瘤组织内部才能更好地发挥疗效,而肿瘤血管在结构和功能上是异常的,血管生成因子和抗血管生成因子之间的不平衡导致肿瘤血管结构的不规则,甚至出现血管渗漏、结构和渗透性的不完整使间质液压力升高,与肿瘤所致的血管压迫一起阻碍细胞毒药物渗透进肿瘤细胞内部,从而影响化疗效果。随着抗肿瘤血管生成的研究逐渐深入,Jain 等^[16-17]提出了肿瘤血管正常化的理论,合理应用抗肿瘤血管生成治疗,能修复肿瘤紊乱的血管网,使肿瘤血管的结构、功能趋于正常化,从而改善局部血液循环,降低肿瘤间质压力,改善肿瘤微环境,更有效地运输氧和药物到肿瘤细胞,从而提高抗肿瘤联合治疗的效果。肿瘤血管正常化期即“窗口期”,为制定合理的治疗方案提供了理论依据。多项研究表明,恩度可使血管重构并渐趋正常化,窗口期为 5~7 天,同时改善肿瘤细胞的乏氧,增加了放疗的敏感性,也更有利于细胞毒药物进入肿瘤组织^[5,18-21]。顺铂直接作用于肿瘤细胞,造成肿瘤细胞坏死,与恩度共同作用效果加强。这从病理生理学角度阐述了临床上抗血管生成药物与化疗药物联用时,一般先使用抗血管生成药物再使用细胞毒药物将会增加疗效。本实验设计是基于血管正常化的理论,同时也避免了顺铂灭活血管内皮抑制素这一糖蛋白的可能性;恩度连续应用第 1~5 天,目的是诱导迂曲的肿瘤血管正常化,第 6 天应用顺铂,第 7~10 天继续应用恩度。本研究显示,恩度联合顺铂治疗组中腹水体积、肿瘤细胞和红细胞明显少于其他 3 组($P < 0.05$),并延长了荷瘤小鼠的生存时间($P < 0.05$);在荷瘤小鼠腹膜渗透性指标上,恩度联合顺铂组与恩度组之间没有显著差异($P > 0.05$),恩度组与顺铂组、对照组比较有显著差异($P < 0.05$)。这提示恩度具有降低荷瘤小鼠腹膜渗透性的能力,而顺铂对荷瘤小鼠腹膜渗透性无明显影响。本研究还观察了联合用药方式对细胞凋亡的影响,结果显示对荷瘤小鼠腹腔积液中肿瘤细胞促凋亡作用主要与顺铂的细胞毒活性密切相关,恩度与顺铂联合无增效作用。关于恩度与顺铂联合起效的机制可能为:(1)顺铂直接作用于肿瘤细胞,诱发了肿瘤细胞的凋亡、坏死,恩度使血管结构改善,降低了荷瘤小鼠的腹膜渗透性,肿瘤细胞和红细胞由异常新生血管进

入腹腔内显著减少;(2)恩度改善了腹膜肿瘤血管的血流,增加了化疗药物在肿瘤血管的输送。可见,恩度联合化疗增强了抗肿瘤的效果,在相同疗效下可以减少化疗药物的用量,达到高效低毒的目的。在本实验中,通过检查小鼠的血常规、肝肾功能,未发现明显异常。

综上所述,利用恩度产生的“窗口期”联合顺铂治疗荷瘤小鼠的腹腔积液疗效确切,安全性好。本研究为恩度和化疗药物进一步优化组合治疗恶性浆膜腔积液提供了理论依据。

参考文献

- [1] 魏红梅,秦叔逵,殷晓进,等. 新型重组人血管内皮抑制素对小鼠腹水瘤的作用特点探讨[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(7): 1509-1513.
- [2] 郑艳花,王琳,姜子瑜,等. 腹腔内连续或间断应用重组人血管内皮抑制素治疗 H22 腹水瘤的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 3(17): 202-206.
- [3] Dong XP, Xiao TH, Dong H, et al. Endostar combined with Cisplatin inhibits tumor growth and lymphatic metastasis of lewis lung carcinoma xenografts in mice[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(5): 3079-3083.
- [4] Chen J, Yao Q, Li D, et al. Neoadjuvant rh-endostatin, docetaxel and epirubicin for breast cancer: efficacy and safety in a prospective, randomized, phase II study[J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 248.
- [5] Jiang XD, Dai P, Wu J, et al. Effect of recombinant human endostatin on radiosensitivity in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 83(4): 1272-1277.
- [6] Becker G, Galandi D, Blum HE, et al. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(5): 589-597.
- [7] Pourgholami MH, Yan CZ, Lu Y, et al. Albendazole: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1928-1935.
- [8] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [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] Kisker O, Becker CM, Prox D, et al. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model[J]. Cancer Res, 2001, 61(20): 7669-7674.
- [11] Yoon SS, Eto H, Lin CM, et al. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases[J]. Cancer Res, 1999, 59(24): 6251-6256.

- [12] Rong B, Yang S, Li W, et al. Systematic review and meta-analysis of Endostar (rh-endostatin) combined with chemotherapy versus chemotherapy alone for treating advanced non-small cell lung cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2012,10:170-181.
- [13] 王金万, 孙 燕, 刘永煜, 等. 重组人血管内皮抑素联合 NP 方案治疗晚期 NSCLC 随机、双盲、对照、多中心 III 期临床研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2005,8(4):283-290.
- [14] Wang J, Sun Y, Qin S, et al. Results of phase IV trial of combining endostar with chemotherapy for treatment of advanced non-small cell lung cancer(NSCLC)[J]. *J Clin Oncol*, 2010,28(15 Suppl):a7598.
- [15] Akhilesh K, Saritha S, D'Souza. Antiangiogenic and antiproliferative using bevacizumab; a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? [J]. *Oncologist*, 2009,14(12):1242-1251.
- [16] Jain RK. Normalizing tumor vasculature with antiangiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy [J]. *Nat Med*, 2001,7(9):987-989.
- [17] Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers [J]. *J Clin Oncol*, 2013,31(17):2205-2218.
- [18] Jiang XD, Dai P, Qiao Y, et al. Clinical study on the recombinant human endostatin regarding improving the blood perfusion and hypoxia of non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2012,14(6):437-443.
- [19] Li N, Zheng D, Wei X, et al. Effects of recombinant human endostatin and its synergy with cisplatin on circulating endothelial cells and tumor vascular normalization in A549 xenograft murine model [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012,138(7):1131-1144.
- [20] Huang G, Chen L. Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010,136(8):1201-1211.
- [21] 聂学诚, 种道群, 邱泗安, 等. 晚期非小细胞肺癌血管正常化时化疗的临床观察 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012,17(07):648-651.

收稿日期:2013-09-13; 修回日期:2013-11-02