

· 论 著 ·

持续小剂量化疗对人肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤 VEGF-C 及其受体 Flt-4 表达的影响^{*}

张明川¹, 梅同华^{2△}, 厉明³

(1. 重庆市铜梁县人民医院呼吸内科 402560; 2. 南昌大学附属第一医院呼吸内科 330006; 3. 山东烟台经济技术开发区医院呼吸内科 264006)

摘要:目的 探讨持续小剂量(LDM)化疗对肺腺癌 A549 细胞荷瘤裸鼠肿瘤组织中血管内皮生长因子-C(VEGF-C)/fms-样酪氨酸激酶-4(Flt-4)轴的影响及其机制。方法 将人肺腺癌 A549 细胞接种于 18 只裸鼠皮下,建立荷瘤动物模型,以随机数字表法将其分为最大耐受剂量(MTD)组(CTX 100 mg·kg⁻¹腹腔注射,隔日 1 次,连续 3 次;n=6)、LDM 组(CTX 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射,n=6)和对照组(0.1 mL 生理盐水腹腔注射,1 次/d;n=6)。治疗 21 d 后脱颈处死裸鼠,取皮下肿瘤组织,采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测肿瘤组织中 VEGF-C、Flt-4 的蛋白及 mRNA 表达。结果 LDM 组裸鼠肿瘤组织 VEGF-C、Flt-4 蛋白及 mRNA 的表达水平均显著低于 MTD 组和对照组($P < 0.05$)。结论 LDM 化疗可能通过降低肿瘤组织 VEGF-C、Flt-4 的表达而减少肺腺癌 A549 荷瘤裸鼠肿瘤的淋巴转移。

关键词:血管内皮生长因子 C;血管内皮生长因子受体 3;肺肿瘤;淋巴管生成;小鼠,裸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)07-0630-03

Influence of low-dose metronomic chemotherapy on expression of VEGF-C and its receptor Flt-4 in lung adenocarcinoma A549 cell xenografts in nude mice^{*}

Zhang Mingchuan¹, Mei Tonghua^{2△}, Li Ming³

(1. Department of Respiratory Medicine, Tongliang People's Hospital of Chongqing, Chongqing 402560, China;

2. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang,

Jiangxi 330006, China; 3. Department of Respiratory Medicine, Hospital of Yantai Economic and

Technological Development Zone, Yantai, Shandong 264006, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects and mechanism of low-dose metronomic (LDM) chemotherapy on VEGF-C/Flt-4 axis in lung adenocarcinoma A549 cell xenografts in nude mice. **Methods** The human lung adenocarcinoma A549 cells were seeded in 18 nude mice to establish tumor-bearing animal models. They were divided into maximum tolerated dose (MTD) group (CTX 100 mg·kg⁻¹ intraperitoneal injection every other day, 3 consecutive times; n=6), LDM group (CTX 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ intraperitoneal injection, n=6) and control group (0.1 mL saline intraperitoneal injection once daily, n=6) according to a random number table. The nude mice were sacrificed by neck luxation after 21 days of treatment, and subcutaneous tumor tissue were subjected to streptavidin-peroxidase (SP) immunohistochemistry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for VEGF-C, Flt-4 protein and mRNA expression detection, respectively. **Results** VEGF-C, Flt-4 protein and mRNA expression level in tumor tissue of nude mice in LDM group were significantly lower than those in MTD group and control group ($P < 0.05$). **Conclusion** LDM chemotherapy may reduce lymphatic metastasis of lung adenocarcinoma A549 cell xenografts in nude mice through decreasing VEGF-C, Flt-4 expression in tumor tissue.

Key words: vascular endothelial growth factor C; vascular endothelial growth factor receptor-3; lung neoplasms; lymphangiogenesis; mice, nude

持续小剂量(low-dose metronomic, LDM)化疗,亦称节奏性化疗,是近年才提出的一种不同于传统最大耐受剂量(maximum tolerable dose, MTD)化疗的新治疗模式。因其抗肿瘤血管生成的作用比常规化疗显著,因此,LDM 化疗又被称为“抗血管生成化疗”^[1-2]。目前,对 LDM 化疗的研究几乎都集中在抗血管生成方面,而其对淋巴管生成影响的报道很少。本研究采用有促淋巴管生成作用的血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)及其受体-3(VEGF receptor, VEGFR-3)/fms-样酪氨酸激酶-4(fms-like tyrosine kinase-4, Flt-4)作为观察指标以了解 LDM 化疗对淋巴管生成的影响,探讨 LDM 化疗在抑制肿瘤淋巴转移方面是否比传统

MTD 化疗更具优势。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/C-nu/nu 裸小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,共 18 只,4~6 周龄,体质量 18~22 g,均雌性。饲养于重庆医科大学实验动物中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物饲养室。动物的饲养及实验取材均遵守实验动物管理与保护相关规定。

1.2 药物与试剂 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;RPMI(Roswell Park Memorial Institute)-1640 细胞培养基为美国 Hyclone 公司产品;环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)为江苏恒瑞医药公司产品(批号:国药准字 H32020857);

* 基金项目:重庆市医疗特色专科建设基金资助项目(200453)。

△ 通讯作者, Tel:15879166333; E-mail: mtonghua@163.com。

链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)免疫组织化学二抗试剂盒(SP-9001)、兔抗人 VEGF-C 单克隆抗体工作液(ZA-0266)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗人 Flt-4 单克隆抗体(BA-0488)购自武汉博士德生物工程有限公司;Biozol 总 RNA 提取试剂为 Bioflux 公司产品;逆转录试剂 Rever TraAce 购自成都博瑞克生物技术有限公司;VEGF-C 及 Flt-4 基因引物采用 primer premier 5.0 软件进行设计,Invitrogen 生物技术有限公司合成;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)由 Invitrogen 生物技术有限公司提供;聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒购自北京天根科技有限公司。

1.3 人肺腺癌 A549 细胞悬液的制备及模型建立

1.3.1 人肺腺癌 A549 细胞悬液的制备 人肺腺癌 A549 细胞株由重庆医科大学超声研究所提供。将 A549 细胞复苏后置于含有 10% (体积分数) 小牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 硫酸链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 5% (体积分数) CO₂、37 °C 条件下常规培养。取对数生长期 A549 细胞, 胰酶消化, 无血清 RPMI-1640 培养基洗涤, 制成细胞密度为 1.0 × 10⁷ 个/mL 的细胞悬液备用。

1.3.2 荷 A549 细胞裸小鼠模型的建立 取 18 只 BALB/C-nu/nu 裸小鼠, 每只于右季肋部皮下以聚维酮碘消毒后接种 A549 细胞悬液 0.1 mL, 细胞注射完毕适度按压针孔, 防止细胞悬液溢出。接种 1 周后开始化疗。

1.4 动物实验 将 18 只荷瘤裸鼠以随机数字表法分为 MTD 组、LDM 组及对照组, 每组 6 只。MTD 组以 CTX 100 mg · kg⁻¹ 腹腔注射, 隔日 1 次, 连续 3 次为 1 疗程, 共 21 d; LDM 组以 CTX 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 腹腔注射, 连续 21 d 为 1 疗程; 对照组以 0.1 mL 生理盐水腹腔注射, 1 次/d, 连续 21 d 为 1 疗程。CTX 以生理盐水现用现配。化疗开始时及开始后每 7 d 用游标卡尺测量肿瘤体积和裸鼠体质量, 肿瘤体积 = 长径 × 宽径² × 0.52^[1]。

1.5 标本采集 1 个疗程的化疗结束后, 脱颈处死动物, 剥离皮下肿瘤组织, 用焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水洗净后分为两部分, 一部分切成小块置入 2 mL 冻存管内, -80 °C 保存。另一部分用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、连续切片, 切片厚 4 μm。

1.6 免疫组织化学检测肿瘤组织 VEGF-C 和 Flt-4 蛋白表达 操作步骤按 SP 试剂盒要求进行, 切片置于 10 mmol/L 枸橼酸缓冲液 (pH=6.0) 中以微波加热修复抗原, 分别滴加兔抗人 VEGF-C 工作液、Flt-4 单克隆抗体 (稀释比例为 1 : 40) 后 4 °C 过夜, 二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色。以磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH=7.4) 代替一抗作为阴性对照, 已知阳性的切片作为阳性对照。

1.7 逆转录 PCR (reverse transcriptase-PCR, RT-PCR) 检测

肿瘤组织中 VEGF-C, Flt-4 基因的表达 操作步骤按照 Bioflux 公司的 Biozol 总 RNA 提取试剂说明书, 1 mL Brizol 试剂中加入 50 mg 组织于 5 mL 匀浆器内充分匀浆 (冰上进行), 提取总 RNA, 紫外分光光度仪 (美国 Bio-Rad) 定量。RNA 逆转录合成 cDNA, 逆转录体系 40 μL, 其中总 RNA 3 μg, 42 °C 水浴 50 min 后进行 PCR 扩增。引物序列如下, VEGF-C: 5'-GCT GGA TGA AGA GAC CTG TC-3', 5'-TCA AAT TCT CGG TTG GCC CC-3', 产物长度 150 bp; Flt-4: 5'-AGT GCA TCC ACA GAG ACC TG-3', 5'-CTT CAT CCT GGA GGA ACC AC-3', 产物长度 665 bp; 内参 GAPDH: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3', 产物长度 450 bp。反应体系: 总体积 25 μL, cDNA 模板 4 μL, 上、下游引物各 1 μL, 2 × MasterMix 12.5 μL, 用 ddH₂O 补足至 25 μL。VEGF-C 反应条件: 94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min; Flt-4 反应条件: 94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 变性 1 min, 61 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。分别取 10 μL 目的基因扩增产物和 4 μL GAPDH 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad) 观察并照相。

1.8 结果处理 将免疫组织化学切片置尼康 (Nikon) TE2000-U 倒置显微镜下, 对所测视野进行准确定位后由 MicroPublisherTM5.0 RTV 摄像系统提取细胞图像, 结果用 Image-Pro Plus 5.1 图像分析系统进行处理, 处理前以标准台尺进行图像校准。每张切片随机选取 4 个完整而不重叠的视野进行定量分析。检测免疫组织化学反应阳性颗粒的累积光密度和面积, 取每张切片的平均值作为测量值。用 Quantity One 软件分析 RT-PCR 产物基因的差异表达, GAPDH 为内参, 以电泳目的条带与内参条带吸光度比值进行分析。

1.9 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和组间 SNK-q (Student Newman Keuls-q) 检验进行显著性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学检测结果 VEGF-C、Flt-4 蛋白阳性表达主要位于细胞质, 呈棕黄色或棕褐色颗粒, 二者在 3 组组织中均有表达, LDM 组与 MTD 组组织中 VEGF-C、Flt-4 蛋白的表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$), LDM 组组织中二者的表达水平显著低于 MTD 组 ($P < 0.05$), 见表 1、封 3 图 1。

2.2 RT-PCR 检测结果 VEGF-C、Flt-4 mRNA 在 3 组组织中均有表达, LDM 组与 MTD 组组织中的 VEGF-C、Flt-4 mRNA 表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$), LDM 组组织中二者的表达水平显著低于 MTD 组 ($P < 0.05$), 见表 1、图 2。

表 1 LDM 组、MTD 组及对照组 VEGF-C、Flt-4 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	VEGF-C			Flt-4		
	阳性面积(μm ²) [*]	累积光密度 [*]	吸光度比值 [#]	阳性面积(μm ²) [*]	累积光密度 [*]	吸光度比值 [#]
对照组	1476.80 ± 320.80	627.40 ± 131.59	35.23 ± 1.03	772.94 ± 80.03	318.95 ± 31.71	29.65 ± 1.41
LDM 组	154.19 ± 43.10 ^{ab}	28.17 ± 6.15 ^{ab}	16.63 ± 0.45 ^{ab}	137.17 ± 20.95 ^{ab}	31.07 ± 4.68 ^{ab}	17.25 ± 3.27 ^{ab}
MTD 组	554.68 ± 57.45 ^a	144.67 ± 16.13 ^a	22.96 ± 0.64 ^a	375.46 ± 67.20 ^a	127.28 ± 21.68 ^a	26.23 ± 1.56 ^a

*: 为免疫组织化学检测蛋白表达结果; #: 为 RT-PCR 检测 mRNA 表达结果; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 MTD 组比较。

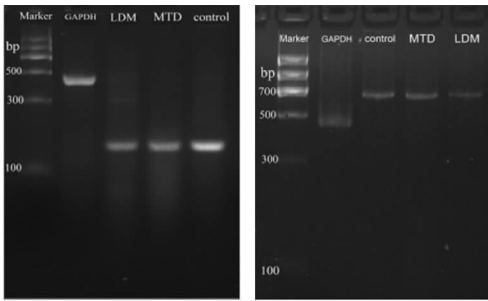


图2 LDM组、MTD组及对照组 VEGF-C(左)、Flt-4(右) mRNA 的凝胶成像图

3 讨论

血行转移和淋巴转移是肿瘤侵袭的两条主要途径。控制恶性肿瘤的转移是治疗的关键。Folkman^[1]于1971年指出肿瘤生长、转移都依赖于血管生成,抑制血管生成能抑制肿瘤生长。此后,有关肿瘤血管生成机制的研究逐渐成为人们关注的热点。LDM化疗是近年才提出的一种不同于传统MTD化疗的新模式,又称为“抗血管生成化疗”^[2]。目前,对LDM化疗的研究几乎都集中在抗血管生成方面,而对淋巴管生成影响的报道很少。本研究采用有促淋巴管生成作用的VEGF-C及其受体VEGFR-3/Flt-4作为观察指标来了解LDM化疗对淋巴管生成的影响,明确在抑制肿瘤淋巴转移方面,LDM化疗是否比传统MTD化疗更有优势。

VEGF-C属于VEGF家族成员之一,最早由Joukov等^[3]分离获得,人VEGF-C基因定位于4q34^[4]。VEGF-C是VEGFR-3/Flt-4的特异性配体,是新近鉴定出的与肿瘤淋巴管生长有关的因子,它通过与Flt-4结合而介导肿瘤淋巴管生成。VEGFR-3/Flt-4是一种从白血病细胞株和人胎盘中克隆得到的酪氨酸激酶受体^[5-6]。Flt-4与VEGF-C和VEGF-D特异性结合,淋巴管形成需要VEGF-C和Flt-4结合,VEGF-C缺乏的小鼠胚胎内皮细胞不能形成淋巴管,最后因组织积液而死亡^[7]。Flt-4通常作为淋巴管特异性标志来检测淋巴管密度^[8],本研究以它作为检测指标,并认为Flt-4阳性表达与淋巴管及淋巴管生成有关。

多项研究表明,VEGF-C的表达是肿瘤淋巴管生成的重要诱发因素^[9],刘钊等^[10-11]发现非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中VEGF-C的高表达与癌旁组织淋巴管的高密度有密切关系,VEGFR-3/Flt-4阳性的脉管数、NSCLC患者淋巴液及血清VEGF-C表达水平高低与肺癌患者淋巴转移有关。淋巴管生成可能是NSCLC淋巴转移的重要因素,VEGF-C参与NSCLC淋巴管生成,促进肿瘤淋巴转移,这一过程可能是一个多因素参与的共同作用过程,这些因素可能成为抗肿瘤淋巴转移治疗的靶点。

Flt-4与其配体VEGF-C结合后能促进肿瘤进展。研究发现VEGF-C/Flt-4轴不仅在淋巴管内皮细胞表达,在多种人类肿瘤细胞内也有表达^[12],这与本研究结果一致。本研究发现VEGF-C主要在肿瘤细胞的细胞质内表达,Flt-4除在肿瘤细胞的细胞质内表达外,还在间质内皮细胞表达(主要是淋巴内皮细胞)。Flt-4在肿瘤细胞的细胞质内表达提示肿瘤生长的初始可能有淋巴因素的参与。肿瘤生长除需要丰富的血供外,淋巴供应是否也是一个必需的因素?这是一个值得研究的课题。作者推测,肿瘤细胞内VEGF-C/Flt-4轴激活后,会激活相应的信号转导途径,导致肿瘤细胞外的淋巴内皮细胞聚集、黏附而形成淋巴管。肿瘤细胞内、外的VEGF-C/Flt-4轴功能

可能不完全相同,即肿瘤周围及内部的淋巴管生成机制可能有所不同。沈小玥等^[13]建立裸鼠模型对肺腺癌成瘤过程中淋巴管的形成进行研究,认为这一过程有3个特点:(1)肺腺癌裸鼠模型的肿瘤生成过程中周围淋巴管密度大于内部;(2)周围淋巴管可能源自已存在的淋巴管发芽或增大的淋巴管分裂;(3)内部淋巴管的形成可能源自间充质前体细胞(淋巴母细胞或血管内皮细胞)的移动和转分化。VEGF-C促进肿瘤淋巴转移的可能机制是VEGF-C与Flt-4结合后,刺激淋巴管内皮增生,降低淋巴管内皮细胞间的黏附,提高淋巴管的通透性。产生VEGF-C的肿瘤细胞可能更易浸润至淋巴管内,导致肿瘤细胞的淋巴转移,即VEGF-C与Flt-4在肿瘤细胞和淋巴管内皮之间形成一条旁分泌通路,参与调节淋巴管的增生及通透性改变,从而影响肿瘤细胞的转移方式^[14]。

LDM化疗是近年才提出的一种不同于常规MTD化疗的新治疗模式。它通过小剂量给药持续作用于肿瘤细胞及其基质而发挥抗肿瘤作用。本研究表明,给予LDM-CTX治疗的肿瘤生长减慢,肿瘤细胞内VEGF-C与Flt-4的表达水平明显降低,疗效明显优于MTD-CTX治疗,推测其可能机制在于化疗药物持续作用于肿瘤细胞,导致:(1)肿瘤细胞生长受到持续抑制,使其单个细胞分泌VEGF-C功能减弱;(2)肿瘤细胞的凋亡增加,使肿瘤组织总VEGF-C及Flt-4表达减少;(3)破坏淋巴管内皮细胞,抑制其增殖,从而使淋巴管内皮细胞表达VEGF-C及Flt-4减少。总之,LDM化疗能显著减少裸鼠移植瘤细胞内VEGF-C及Flt-4的表达。本课题组将进一步研究淋巴管生成的相关因子——VEGF-C/Flt-4在肿瘤细胞内的表达及其在肿瘤生长与转移过程中的作用。

参考文献:

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21):1182-1186.
- [2] Kieran MW, Turner CD, Rubin JB, et al. A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2005, 27(11):573-581.
- [3] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases [J]. *EMBO J*, 1996, 15(2):290-298.
- [4] Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D, et al. Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively [J]. *Circulation*, 1996, 93(6):1079-1082.
- [5] Pajusola K, Aprelikova O, Armstrong E, et al. Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts [J]. *Oncogene*, 1993, 8(11):2931-2937.
- [6] Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ, et al. The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor [J]. *Oncogene*, 1993, 8(5):1233-1240.
- [7] Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic (下转第 636 页)

为筛选颅内动脉瘤实验指标具有重要的潜在价值和一定的前景。首先,该方法血清样本容易获得,对患者创伤性小,检查耗时短,费用低,有利于临床高危人群筛选的应用和推广;其次,通过对颅内动脉瘤的蛋白质表达差异情况进行研究,进而对差异蛋白数量、结构、性质、相互关系和生物学功能进行全面分析,明确颅内动脉瘤血清差异蛋白在此疾病发生、发展过程中的作用,从而对颅内动脉瘤进行诊断和筛选,并可对这些“关键”蛋白进行干预,为基因治疗颅内动脉瘤提供临床和实验资料。然而,本研究在诸多方面还需进一步深入,如对实验方法的完善以及实验条件的标准化,以增强实验可重复性,并进行多中心、大样本的联合研究。通过对这些潜在的生物标志物进行精确鉴定,确定其在动脉瘤发生、发展、破裂过程中的具体作用,为颅内动脉瘤的临床筛选提供可靠的实验依据。

参考文献:

[1] Menghini VV, Brown RD Jr, Sicks JD, et al. Clinical manifestations and survival rates among patients with saccular intracranial aneurysms: population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1965 to 1995[J]. *Neurosurgery*, 2001, 49(2): 251-256.

[2] 翟宝进, 刘欣民, 李双英, 等. 颅内动脉瘤患者血清差异表达蛋白质的研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2010, 26(10): 891-895.

[3] Joo SP, Kim TS, Kim YS, et al. Clinical utility of multi-slice computed tomographic angiography for detection of cerebral vasospasm in acute subarachnoid hemorrhage[J]. *Minim Invasive Neurosurg*, 2006, 49(5): 286-290.

[4] 林维斌, 何理盛. 颅内动脉瘤诊断与治疗的现状及进展[J]. *福建医药杂志*, 2007, 29(2): 98-100.

[5] Yang YJ, Chen WJ, Zhang Y, et al. Diagnostic value of CTA and MRA in intracranial traumatic aneurysms[J]. *Chin J Traumatol*, 2007, 10(1): 29-33.

[6] 杨呈浩, 李定君, 詹书良. 与颅内动脉瘤发病机制相关基

因研究现状[J]. *泸州医学院学报*, 2007, 30(6): 541-543.

[7] Lu HB, Zhou JH, Ma YY, et al. Five serum proteins identified using SELDI-TOF-MS as potential biomarkers of gastric cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(4): 336-342.

[8] Araki Y, Yoshikawa K, Okamoto S, et al. Identification of novel biomarker candidates by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with moyamoya disease using SELDI-TOF-MS[J]. *BMC Neurol*, 2010, 10: 112.

[9] 伍健, 黄培林. SELDI 蛋白质芯片技术在肿瘤蛋白质组学研究中的应用[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2004, 23(5): 347-350.

[10] Lin YW, Lin CY, Lai HC, et al. Plasma proteomic pattern as biomarkers for ovarian cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16 Suppl 1: S139-146.

[11] 谭小林, 任兴军, 王开正, 等. 食管癌血清差异蛋白质组测定结果分析[J]. *重庆医学*, 2011, 40(7): 641-643.

[12] 张蓉, 张莉. 心理训练对心理应激后陆军特种兵血清蛋白质谱特征的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2011, 35(9): 985-987.

[13] 李杰, 陈茂伟, 周怡, 等. 乙型肝炎肝硬化血清标记物筛选的初步研究[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(15): 2724-2727

[14] Dursun E, Monari E, Cuoghi A, et al. Proteomic profiling during atherosclerosis progression using SELDI-TOF-MS: effect of darbepoetin treatment[J]. *Acta Histochem*, 2010, 112(5): 432-443.

[15] Zhang MZ, Sun ZC, Fu XR, et al. Analysis of serum proteome profiles of non-Hodgkin lymphoma for biomarker identification[J]. *J Proteomics*, 2009, 72(6): 952-959.

[16] 吕晶晶, 高春芳, 王秀丽, 等. SELDI-TOF-MS 技术在结肠腺瘤血清蛋白质指纹图谱筛查模型建立中的应用[J]. *山东医药*, 2010, 50(34): 7-9.

(收稿日期: 2011-10-27 修回日期: 2011-11-05)

(上接第 632 页)

veins[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(1): 74-80.

[8] Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(8): 3566-3570.

[9] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1786-1790.

[10] 刘钊, 周斌, 赵坚, 等. VEGF-C 和 VEGFR-3 在非小细胞肺癌组织及癌旁组织中的表达及意义[J]. *临床肺科杂志*, 2010, 15(9): 1217-1219.

[11] 刘钊, 周斌, 赵坚, 等. VEGF-C 在非小细胞肺癌血清及淋

巴液中的表达及意义[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(4): 357-359.

[12] Su JL, Yen CJ, Chen PS, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(4): 541-545.

[13] 沈小玥, 吴鄂生, 胡成平, 等. 肺腺癌成瘤过程中淋巴管形成的动物实验研究[J]. *四川医学*, 2004, 25(12): 1280-1282.

[14] Yonemura Y, Fushida S, Bando E, et al. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(7): 918-923.

(收稿日期: 2011-09-10 修回日期: 2011-10-22)