

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.005

· 基础研究 ·

NRP-1 单抗联合节律化疗对裸鼠胃癌移植瘤生长的抑制

丁园¹, 徐芸¹, 陈玉强¹, 颜江华² (1. 厦门大学附属成功医院/中国人民解放军第174医院肿瘤治疗中心, 福建厦门 361003; 2. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361000)

[摘要] **目的:** 探讨NRP-1单抗联合多西他赛节律化疗对胃癌裸鼠移植瘤的抗肿瘤疗效。**方法:** BALB/c裸鼠皮下接种胃癌BGC-823细胞制备移植瘤模型, 将荷瘤裸鼠以数字随机表法随机分为对照组、NRP-1单抗组、节律化疗组(MCT)、联合组(NRP-1mAb+MCT), 每组6只。除对照组, 其余各组于造模第8天开始分别给予相应治疗, 给药2周, 观察裸鼠一般状况, 隔天测量裸鼠体重及肿瘤体积。裸鼠处死后称瘤质量, H-E染色观察瘤组织形态, 免疫组化检测裸鼠瘤组织中NRP-1蛋白、VEGF、MVD表达。**结果:** 联合组移植瘤的体积和质量显著低于其他各组[(0.394±0.128) vs (0.748±0.152)、(0.867±0.361)、(1.247±0.494) g; (0.613±0.223) vs (0.866±0.115)、(1.098±0.343)、(1.474±0.644) cm³。均P<0.05], 抑瘤率较其他治疗组差异有统计学意义(P<0.05)。对照组瘤组织细胞生长良好, 血管丰富, 给药组瘤组织出现不同程度的片状坏死, 血管成分减少。免疫组化染色显示, 对照组NRP-1表达明显高于治疗各组(P<0.05), 联合组的NRP-1、VEGF、MVD表达均显著低于其余各组(P<0.05)。**结论:** NRP-1单抗联合多西他赛节律化疗可能通过下调NRP-1表达而显著抑制BGC-823胃癌移植瘤的生长及血管生成。

[关键词] 胃癌; 裸鼠移植瘤; 抗NRP-1单克隆抗体; 节律化疗; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R735.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)012-1370-05

NRP-1 monoclonal antibody in combination with metronomic chemotherapy (MCT) inhibits the growth of gastric cancer xenografts in nude mice

DING Yuan¹, XU Yun¹, CHEN Yuqiang¹, YAN Jianghua² (1. Department of Oncology, No. 174 Hospital of PLA, Chenggong Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian, China; 2. Cancer Research Center, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitumor effect of NRP-1 monoclonal antibody combined with docetaxel metronomic chemotherapy in nude mice bearing gastric cancer xenografts. **Methods:** BALB/c mice were inoculated subcutaneously with BGC-823 cells to establish xenograft model; the tumor bearing rats were randomly divided into control group, NRP-1 monoclonal antibody group (NRP-1mAb), rhythm chemotherapy group (MCT) and combined group (NRP-1mAb+MCT). Except the control group, the other three groups were given the corresponding treatment on the 8th day after the model establishment. After 2 weeks of administration, the general condition of nude mice was observed and the body weight and tumor volume were measured the next day. The mice were sacrificed and the mass of tumor was calculated; HE staining was used to observe the morphology of the tumor tissue. The expression of NRP-1 protein, VEGF and MVD were detected by immunohistochemistry. **Results:** The tumor volume (0.613±0.223 vs 0.866±0.115, 1.098±0.343, 1.474±0.644 V/cm³; P<0.05) and weight (0.394±0.128 vs 0.748±0.152, 0.867±0.361, 1.247±0.494 m/g; P<0.05) of the combined group were significantly lower than those of the other groups, and the tumor inhibition rate was statistically higher compared with the other treatment groups (P<0.05). Under microscope, the cancer cells in the control group were well grown and the blood vessels were rich; the cancerous tissues of each treatment group showed different degree of sheet necrosis and the blood vessel composition decreased. Immunohistochemistry results showed that the expression of NRP-1 in the control group was signifi-

[基金项目] 厦门市科技计划创新项目资助(No.3502z20134026, No.3502z20144034)。Project supported by the Science and Technology Innovation Programme of Xiamen (No.3502z20134026, No.3502z20144034)

[作者简介] 丁园(1983-),女,主治医师,主要从事肿瘤免疫治疗研究,E-mail:dingyuan242007@sina.com

[通信作者] 陈玉强(Chen Yuqiang, corresponding author),博士,主任医师,主要从事肿瘤靶向治疗研究,E-mail:chenyq707@163.com

[优先出版] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20171215.1825.012.html>

cantly higher than that in each treatment group ($P<0.05$); and the expression of NRP-1, VEGF and MVD in combined treatment group was significantly lower than the other groups. **Conclusion:** NRP-1 monoclonal antibody combined with docetaxel rhythmic chemotherapy may significantly inhibit the growth and angiogenesis of BGC-823 gastric cancer by down-regulating the expression of NRP-1.

[Key words] gastric cancer; transplanted tumor in nude mice; NRP-1 mAb; metronomic chemotherapy(MCT); vascular endothelial growth factor(VEGF)

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(12): 1370-1374. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.005]

胃癌是我国常见的消化道肿瘤,术后易复发和转移,手术、化疗、靶向治疗是防止术后复发、控制转移的主要治疗手段。为了提高化疗有效率,减轻毒副作用,降低耐药性,21世纪初国外学者提出了节律化疗(metronomic chemotherapy, MCT)^[1]的概念,即一种小剂量、高频率、短间隔化疗给药模式,它不仅能直接作用于肿瘤细胞,还可通过选择性地抑制肿瘤组织内新生血管的生成和改变肿瘤生长的微环境等机制发挥抗肿瘤作用,且在联用抗血管生成药物时效果更显著。

近年来抗肿瘤血管生成药物如贝伐单抗、重组人血管内皮抑制素及单克隆抗体曲妥珠单抗等分子靶向药物被用于胃癌联合化疗中,但受到基因表达差异的影响,仅有15%~40%的中晚期胃癌患者从中获益。寻找人群中普遍表达的有效靶点,是靶向药物开发成功的关键。神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1, NRP-1)作为多功能受体参与多种细胞因子的信号转导从而促进肿瘤血管生成,抗NRP-1有望成为新的治疗靶点。本课题将前期制备的NRP-1 b1/b2 IgG1型特异性单克隆抗体(NRP-1mAb)(已获得国家专利,专利号为ZL201310236974.5)联合多西他赛节律化疗作用胃癌移植瘤裸鼠模型,观察抗肿瘤疗效,初步探讨其在胃癌治疗中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、细胞株与实验动物

DMEM培养基为Gibco BRL产品,胎牛血清、链霉素/青霉素、胰蛋白酶/EDTA为Sigma产品,免疫组化试剂盒为迈新产品,多西他赛注射液为江苏奥赛康药业股份有限公司产品(生产批号为国药准字J20090104)。NRP-1 b1/b2 mAb为本实验室从小鼠抗NRP-1杂交瘤产生的腹水中提取,并通过亲和层析法纯化备用^[2]。

胃癌细胞BGC823为本实验室保存的细胞株,抗NRP-1杂交瘤株为本实验室通过杂交瘤细胞技术制备并保存。动物选择清洁级6~8周龄的雌性BALB/c裸鼠,由厦门大学动物房提供(合格证号为2013001805569)。

1.2 动物模型的建立

常规培养BGC-823胃癌细胞,取对数生长期细胞制成瘤细胞悬液,0.4%锥虫蓝染色计数,细胞活力>95%,调整细胞密度为 1×10^7 个/ml。取上述瘤细胞悬液0.2 ml(含瘤细胞数 2×10^6 个)接种于BALB/C裸鼠右腋部皮下。每3 d观察肿瘤的生长情况,待瘤体体积达到约100 mm³即确定为成瘤。

1.3 分组及用药

将荷瘤裸鼠按随机数字表法分为4组,每组6只。生理盐水对照组(对照组, Ctrl)腹腔注射生理盐水,0.2 ml, 1次/d; NRP-1mAb组(NRP-1mAb)尾静脉注射NRP-1mAb, 5 mg/kg, 1次/2 d; 多西他赛节律化疗组(MCT)腹腔注射多西他赛, 0.5 mg/kg, 1次/d; NRP-1mAb联合多西他赛节律化疗组(联合组, NRP-1mAb+MCT)尾静脉注射NRP-1mAb, 5 mg/kg, 1次/2 d,同时腹腔注射多西他赛, 0.5 mg/kg, 1次/d。以上各组均于瘤细胞接种后第8天(均已成瘤)开始给药,于接种后第24天全部断颈处死。

1.4 观察裸鼠状态及肿瘤生长情况和抑瘤率测定

每次给药前观察裸鼠的食欲、运动及精神变化,隔天称量裸鼠的体质量,并用游标卡尺测量肿瘤的长和宽,按照公式计算体积(cm^3)= $0.5 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{宽}$)。末次采血后,颈椎脱臼处死裸鼠,并迅速剥离瘤体,用精度为1 mg的天平称量瘤体质重,按照公式计算抑瘤率(IR), $\text{IR}(\%) = (\text{C}-\text{Tx})/\text{C} \times 100\%$ (C为对照组测量的平均肿瘤体积或体质量, Tx为各治疗组测量的平均肿瘤体积或体质量)。

1.5 免疫组化法测定移植瘤组织中NRP-1蛋白表达

将移植瘤石蜡切片分别置于二甲苯、50%二甲苯/乙醇中浸泡脱水后进行抗原修复,灭活内源性过氧化物酶活性,滴加5%羊血清封闭非特异性蛋白,加入一抗(NRP-1抗体1:100稀释),置于37℃恒温箱静置孵育1 h,从冰箱中取出后置于37℃复温30 min,弃去一抗, PBS洗涤。滴入二抗(IgG生物素)37℃恒温箱中孵育10 min,弃去二抗, PBS洗涤。甩干玻片,加入链霉菌抗生素蛋白-过氧化酶后,放入湿盒,置于37℃恒温箱中反应10 min。PBS洗涤后DAB显色、苏木精复染、分化、蓝化,重新脱水、透明、封片。光学显微镜下观察染色情况及拍照。

染色的结果判定:NRP-1均以细胞膜出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,对每张切片在高倍镜($\times 400$)下计数5个视野。将NRP-1的染色数量及染色强度依据以下标准半定量,结果取平均值。染色强度:不着色0分,淡黄色1分,棕色2分,棕褐色3分。染色数量:染色阳性细胞数占总细胞数的比率 $\leq 5\%$ 为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分, $\geq 76\%$ 为4分。染色强度与染色数量计分相乘结果0~4分为低表达,5~12分为高表达。

1.6 免疫组化法测定移植瘤组织中 VEGF、MVD 表达

将NRP-1表达测定中的一抗换成兔抗鼠 VEGF、CD34 抗体,其余步骤同 NRP-1 蛋白的测定方法。VEGF 表达检测方法同 NRP-1。血管生成的判断标准:被 CD34 抗体染成棕黄色的单个细胞或细胞团,不管它是否形成管腔,只要它与周围的微血管、肿瘤细胞和其他连接组织成分有一个清楚的分隔,都认为是一个可计数的微血管。肿瘤内硬化区以及与肿瘤交界处软组织内的微血管不计数,有厚的平滑肌壁以及管腔直径 > 8 个红细胞直径的血管也排除在外。在100倍低倍镜选择3个血管密度高的区域,然后在400倍高倍镜下计数不同区域的血管,取平均值为微血管密度(microvessel density, MVD)。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,其中两两比较用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NRP-1 单抗联合节律化疗显著抑制裸鼠胃癌移植瘤质量和体积

于接种细胞 7 d 前后瘤结直径均达成瘤标准。治疗过程中,除对照组肿瘤仍呈持续快速生长外,各

治疗组肿瘤生长趋缓,质地稍硬。治疗结束时,各治疗组瘤体体积明显小于对照组,其中联合组移植瘤体积、质量均明显低于其他组,IR 显著高于各单药组($P < 0.05$,表1)。

表1 NRP-1 单抗联合节律化疗抑制裸鼠胃癌移植瘤的质量和体积($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 NRP-1 monoclonal antibody in combined with metronomic chemotherapy (MCT) reduced the volume and mass of gastric cancer xenografts in nude mic($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Mass(m/g)	Volume(V/cm^3)	IR(%)
Ctrl	1.247 \pm 0.494	1.474 \pm 0.644	—
NRP-1mAb	0.867 \pm 0.361	1.098 \pm 0.343	30.43
MCT	0.748 \pm 0.152	0.866 \pm 0.115	40.01
NRP-1mAb+MCT	0.394 \pm 0.128*	0.613 \pm 0.223*	68.39*

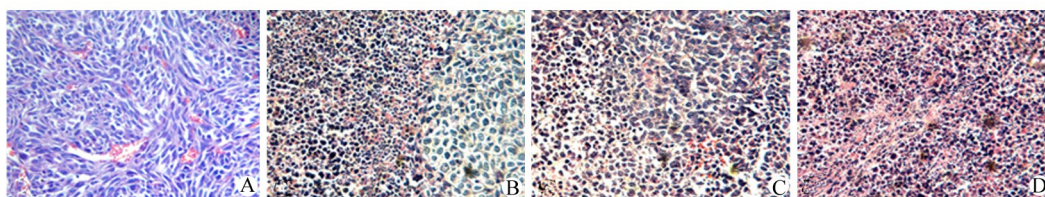
* $P < 0.05$ vs other groups

2.2 NRP-1 单抗联合节律化疗抑制裸鼠胃癌移植瘤细胞生长

移植瘤组织 H-E 染色后光镜下观察结果(图1)显示,对照组瘤细胞生长良好、瘤组织血管丰富;NRP-1mAb 组和 MCT 组瘤组织中心及边缘瘤多见小片状或大片状坏死;NRP-1mAb+MCT 联合组瘤组织全为固缩、坏死灶,未见血管成分。

2.3 联合治疗后移植瘤组织中 NRP-1 表达水平显著下降

H-E 染色光镜下观察 NRP-1 在瘤组织中的表达,结果显示,对照组瘤细胞胞膜上可见深染的黄褐色;NRP-1mAb 组、MCT 组瘤细胞包膜上所染的棕黄色依次变淡;联合组瘤细胞崩解、坏死,几乎无有效染色(图2)。NRP-1mAb 组 NRP-1 阳性表达显著低于其他各组,较单药组有统计学差异($P < 0.01$;图2,表2)。



A: Ctr group; B: NRP-1mAb group; C: MCT group; D: NRP-1mAb+MCT group

图1 NRP-1 单抗联合节律化疗抑制裸鼠胃癌移植瘤生长(H-E, $\times 400$)

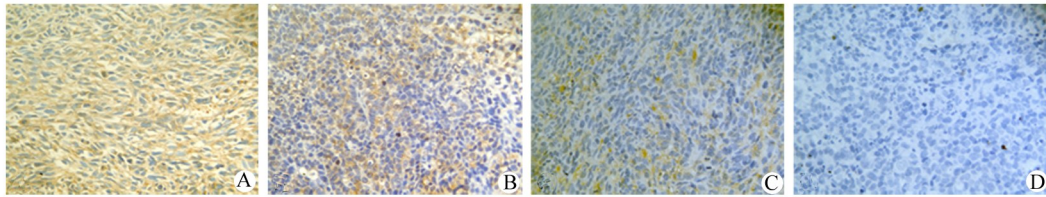
Fig.1 NRP-1 monoclonal antibody in combined with metronomic chemotherapy (MCT) inhibited the growth of gastric cancer xenografts in nude mice (H-E, $\times 400$)

2.4 联合治疗后移植瘤组织中 VEGF、MVD 表达的水平明显下降

H-E 染色光镜下观察 VEGF、MVD 在瘤组织中的表达,结果显示,对照组中瘤细胞可见深染的棕褐

色;各治疗组瘤细胞所染的棕黄色依次减弱。与对照组比较,各治疗组瘤组织 MVD、VEGF 表达均下降,有统计学意义($P < 0.05$),NRP-1mAb 组、MTD 组 MVD、VEGF 表达无显著差异($P > 0.05$);与单药组比

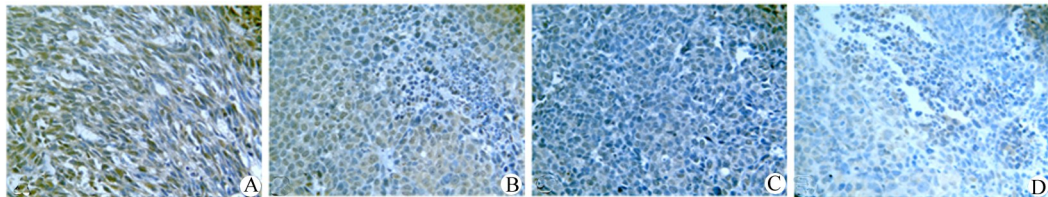
较,联合组MVD、VEGF表达显著下降($P<0.01$;图3、4,表2)。



A:Ctrl group; B:NRP-1mAb group; C: MCT group; D:NRP-1mAb+MCT group

图2 NRP-1mAb与MCT联合治疗后移植瘤组织中NRP-1表达水平下降($\times 400$)

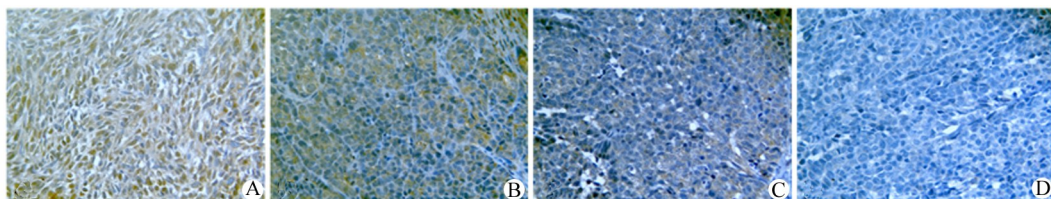
Fig.2 NRP-1 expression was decreased in xenograft tissues after the treatment of NRP-1mAb combined with MCT therapy($\times 400$)



A: Ctrl group; B: NRP-1mAb group; C: MCT group; D: NRP-1mAb+MCT group

图3 NRP-1mAb与MCT联合治疗后移植瘤组织中VEGF表达水平下降($\times 400$)

Fig.3 VEGF expression was decreased in xenograft tissues after the treatment of NRP-1mAb combined with MCT therapy($\times 400$)



A:Ctrl group; B: NRP-1mAb group; C: MCT group; D: NRP-1mAb+MCT group

图4 NRP-1mAb与MCT联合治疗后移植瘤组织中MVD表达水平下降($\times 400$)

Fig.4 MVD expression was decreased in xenograft tissues after the treatment of NRP-1mAb combined with MCT therapy($\times 400$)

表2 NRP-1mAb与MCT联合治疗后移植瘤组织中MVD和VEGF表达水平下降($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Expressions of MVD and VEGF descended after NRP-1mAb combined with MCT therapy in gastric cancer model ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Groups	MVD	VEGF	NRP-1
Ctrl	28.74 \pm 1.98	73.48 \pm 3.07	10.16 \pm 2.04
NRP-1mAb	18.02 \pm 1.58	48.86 \pm 2.56	5.50 \pm 1.64
MCT	15.52 \pm 1.64	44.02 \pm 2.33	5.83 \pm 1.83
NRP-1mAb+MCT	6.78 \pm 1.76**	18.34 \pm 2.57**	2.17 \pm 0.98**

** $P<0.01$ vs other groups

3 讨论

1971年,Folkman首次提出“肿瘤生长依赖于血管生成”,人们便开始研究抗肿瘤血管生成药物,包括化疗药和分子靶向药。NRP-1是相对分子质量为120 000~140 000的I型穿膜糖蛋白,在多种肿瘤组织中呈高表

达。NRP-1作为VEGFR-2的共受体可增强VEGF165与VEGFR-2的结合,增加VEGFR2的蛋白磷酸化程度,负责诱导内皮细胞趋化作用,促进肿瘤血管生成^[3-4]。NRP-1还能够以不依赖VEGF的方式,通过与酪氨酸激酶ABL1形成复合物,重塑肌动蛋白,诱导血管新生^[5]。抑制NRP-1蛋白表达,例如用特异性siRNA沉默NRP-1^[6],不仅能够抑制肿瘤血管生成,还能抑制多种生长因子的活性,增加对化疗药物的敏感性,逆转耐药。本实验室前期发现的NRP-1mAb的作用^[7]在胃癌动物实验中被证实,能够有效抑制NRP-1,显著降低肿瘤组织内VEGF、MVD的表达,从而减少肿瘤组织内血管的生成。

传统化疗药物旨在短时间内最大程度杀伤肿瘤细胞,诱导肿瘤微血管内皮细胞凋亡,但较长的化疗间歇使得受损的肿瘤血管系统得以重建,不能带来持久疗效,且副反应大,常伴有肿瘤耐药的产生。节律化疗较传统化疗优势在于:能明显降低机体耐药

性及药物毒性,抑瘤谱广且效果明显。本实验选择胃癌一线药物多西他赛进行节律化疗,它属于半合成紫杉烷类抗肿瘤药,除了具有促进微管形成,使细胞停滞在有丝分裂G2~M期的作用,还有抗血管生成作用。其机制^[8]可能为:直接作用内皮细胞,抑制肿瘤组织MVD;通过下调VEGF间接抑制肿瘤血管形成;通过上调血小板反应素1(thrombospondins-1, TSP-1)水平间接干扰肿瘤血管形成。本实验结果显示,单纯节律化疗组除了能够抑制VEGF、MVD表达,对NRP-1也有抑制作用,促进肿瘤细胞坏死,抑制肿瘤生长。

在多个多中心联合的胃癌治疗临床试验中,如著名的ToGA、REAL3、AVAGAST等研究结果均显示,分子靶向药物联合化疗较单纯化疗组,能够显著改善晚期胃癌患者的中位生存期,提高总体反应率,但靶向药物的选择,需针对特殊基因位点表达的适应人群^[9-11]。在本实验中,首先可以观察到NRP-1 mAb组、MCT组、联合组裸鼠的食欲较佳、活动较灵活、皮毛光泽,而对照组裸鼠食欲较差、行动迟缓、皮毛失去光泽。对照组的移植瘤生长迅速;联合组移植瘤生长较NRP-1mAb、MCT单药组缓慢,肿瘤生长在一段时间内得到了控制。在H-E染色光镜下观察发现:联合组瘤组织几乎无完整肿瘤血管生成,癌细胞多固缩、坏死。免疫组化结果显示,联合组NRP-1蛋白表达率较对照组及单药组显著降低。由此证明,NRP-1mAb联合多西他赛节律化疗对胃癌细胞BGC823具有一定的直接杀伤作用,但更主要的则是通过破坏肿瘤内的血管生成而致肿瘤细胞缺血坏死。其可能机制之一是通过下调裸鼠肿瘤组织中NRP-1的表达而间接实现抗肿瘤作用。

目前,肿瘤靶向治疗取得较大进展^[12],以NRP-1为靶点的分子靶向治疗研究,在结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌等瘤种的体内实验体现出较好的抗肿瘤疗效^[13]。本实验将该抗体与多西他赛联合应用胃癌的治疗,旨在开发该抗体成为一种新型的用于胃癌临床综合治疗的抗肿瘤药物。此外,在本实验中多西他赛节律化疗的最适剂量、间隔时间,以及节律性化疗是否存在其他未知的风险,目前尚无确切结论,值得进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] HANAHAHAN D, BERGERS G, BERGSLAND E. Less is more, regularly:metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice[J]. *Clin Invest*, 2000, 105(8): 1045-1047. DOI: 10.1172/JCI9872
- [2] 倪二茹, 曾凡伟. 抗人NRP1单克隆抗体的活性鉴定及初步应用[J]. *免疫学杂志*, 2012, 8(28): 651-655. DOI:10.13431/j.cnki.immunol.j.20120151
- [3] NAM JO, SON HN, JUN E, et al. FAS1 domain protein inhibits VEGF165-induced angiogenesis by targeting the interaction between VEGF-2 and $\alpha v \beta 3$ integrin[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(8): 1010-1020. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0600.
- [4] NOWACKA M M, OBUCHOWICZ E. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action[J]. *Neuropeptides*, 2012, 46(1): 1-10. DOI: 10.1016/j.npep.2011.05.005.
- [5] RAIMONDI C, FANTINA, LAMPROPOULOU A, et al. Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(6): 1167-1183. DOI: 10.1084/jem.20132330.
- [6] JIA H, CHENG L, TICKNER M, et al. Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(3): 541-552. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605539.
- [7] 丁园, 周娟, 等. NRP-1b1/b2单克隆抗体对裸鼠胃癌移植瘤生长的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(24): 3901-3904. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2016.24.007.
- [8] 钱晓萍, 马亚军, 胡静, 等. 参麦注射液联合多西他赛对荷瘤裸鼠肿瘤血管生长的抑制作用及其机制[J]. *中国癌症杂志*, 2009, 19(4): 252-256. DOI: 1007-3639(2009)04-0252-05.
- [9] BANG Y U, VANCUTSE M E, FEYEREISLOV A A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer(ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial[J]. *The Lancet*, 2010, 376(9742): 687-697. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- [10] WADDELL T, CHAU I, CUNNINGHAM D, et al. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial[J]. *The Lancet Oncology*, 2013, 14(6): 481-489. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70096-2.
- [11] OHTSU A, SHAL M A, VAN CUTSEM E, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study[J]. *J Clin Oncol*, 2011(29): 3968-3976. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.2236.
- [12] 董坚. 实体肿瘤靶向药物疗效评价标准的现状和展望[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(4): 413-419. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.001.
- [13] NADEJDA VINTONENKO, IRMA PELAIEZ-GARAVITO. Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions[J]. *Cell Adhesion & Migration*, 2011(6): 332-343. DOI: 10.4161/cam.5.4.17287.

[收稿日期] 2017-07-11

[修回日期] 2017-11-01

[本文编辑] 韩丹