

结直肠癌转移模型裸鼠血管因子变化及 健脾消癌方干预作用

李勇敏, 谭小宁, 徐琳本, 吕元, 奚剑敏, 蒋益兰*
(湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006)

[摘要] **目的:**探讨结直肠癌裸鼠转移模型组织中血管内皮生长因子(VEGF),内皮抑素(ES),血管生成素(ANG),血管抑素(AS),基质金属蛋白酶-9(MMP-9),组织金属蛋白酶抑制物(TIMP)变化及健脾消癌方干预的机制。**方法:**在BALB/C-nu裸鼠盲肠内注射HCT116细胞50 μL,造裸鼠结直肠癌转移模型。将模型裸鼠分为模型组、健脾消癌方组(40 g·kg⁻¹),另设空白组。所有动物灌胃给予相应药物4周后,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定裸鼠结肠、肝、肺及盲肠肿瘤组织中相关血管因子蛋白表达。**结果:**HCT116结直肠癌模型裸鼠的结肠、肝、肺与肿瘤组织的VEGF,MMP-9,TIMP明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);ANG在结肠、肝与肿瘤组织也明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);ES在结肠、肺与肿瘤组织显著降低,AS在肝、肺及肿瘤组织显著降低($P < 0.05$)。健脾消癌方组的结肠MMP-9,肿瘤TIMP,肝组织ANG,MMP-9及肺组织VEGF明显降低,肺组织AS明显升高($P < 0.05$)。**结论:**HCT116结直肠癌模型裸鼠VEGF,ANG,MMP-9在结肠、肝、肺及肿瘤组织中蛋白表达升高,ES,AS降低,TIMP升高;健脾消癌方能比较全面地改善机体抗肿瘤血管生成的能力。

[关键词] 健脾消癌方;结直肠癌转移;血管内皮生长因子(VEGF);内皮抑素(ES);血管生成素(ANG);血管抑素(AS);基质金属蛋白酶-9(MMP-9);组织金属蛋白酶抑制物(TIMP)

[中图分类号] R285.5;R22;R241.2;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0167-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20180686

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171213.0851.006.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 14:11

Changes of Blood Vessel Factors in Nude Mice Model with Colorectal Cancer Metastasis and Invention Effect of Jianpi Xiaoi Prescription

LI Yong-min, TAN Xiao-ning, XU Lin-ben, LYU Yuan, XI Jian-min, JIANG Yi-lan*

(Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes in vascular endothelial growth factor (VEGF), endostatin (ES), angiogenesis factors (ANG), angiostatin (AS), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in tissues of nude mice with rectal cancer metastasis model, and the intervention mechanism of Jianpi Xiaoi prescription. **Method:** HCT116 cells were injected into the BALB/C-nu nude mice, so as to establish the model of colorectal cancer metastasis. The model nude mice were divided into model group and Jianpi Xiaoi prescription group; and control group was also set up. After 4 weeks of administration, the expression of vascular factor in colon, liver, lung and tumor tissues of nude mice was measured by Western blot. **Result:** VEGF, MMP-9 and TIMP-1 of colon, liver, lung and tumor tissues in HCT116 rectal

[收稿日期] 20171030(006)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373602);湖南省科技计划科研条件创新专项(2013TT1004);湖南省自然科学基金项目(14JJ4067)

[第一作者] 李勇敏,硕士生导师,研究员,从事中医药治疗肿瘤转移的机制研究,Tel:0731-85920129,E-mail:lym0937@126.com

[通信作者] *蒋益兰,博士生导师,主任医师,从事中医药防治恶性肿瘤的临床及实验研究,Tel:0731-85920129,E-mail:tianshangren624@163.com

cancer model nude mice increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ANG in colon, liver and tumor tissues was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ES was significantly lower in colon, lung and tumor tissues, while as significantly reduced in liver, lung and tumor tissues ($P < 0.05$). Colon MMP-9, tumor TIMP, liver tissue ANG, MMP-9 and lung tissue VEGF were significantly decreased in Jianpi Xiaoi prescription group, whereas AS was significantly increased ($P < 0.05$) in lung tissues. **Conclusion:** The expressions of VEGF, ANG and MMP-9 of colon, liver, lung and tumor tissues in HCT116 colorectal cancer model nude mice increase, while ES, AS reduce, and TIMP rose. Jianpi Xiaoi prescription can comprehensively improve the anti-tumor angiogenesis capacity.

[Key words] Jianpi Xiaoi prescription; colorectal cancer metastasis; vascular endothelial growth factor (VEGF); endostatin (ES); angiogenesis factors (ANG); angiostatin (AS); matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP)

癌症治疗最大的挑战就是肿瘤转移,约有90%的癌症患者死于转移^[1]。结直肠癌是世界上第3大常见的肿瘤,已成为危害居民健康的恶性肿瘤之一^[2]。结直肠癌治疗手段主要包括手术、化疗和放疗,但是放化疗不良反应严重,而且只针对肿瘤细胞进行治疗,却忽略了肿瘤血管,为肿瘤的复发和转移留下了祸根^[3-4]。针对肿瘤血管生成方面,目前抗肿瘤血管生成的靶向药物取得了可喜成果,然而肿瘤临床依然有许多难题,如抗血管生成的靶点选择、耐药性和细胞毒性等。其原因是,肿瘤血管生成是一个多步骤多因素的复杂调控过程,靠单纯阻断血管生成的一个环节远远不够^[5-6]。现阶段抗肿瘤药物从作用机制分析主要包括干扰核酸的生物合成、破坏DNA的结构和功能、干扰DNA的转录、影响蛋白质的合成、影响体内激素的平衡的药物,还有一些以细胞信号转导分子为靶点的抗肿瘤药物以及肿瘤血管生成抑制剂^[7-8]。中药抗肿瘤因其毒副作用相对较小,作用靶点广泛,越来越受到重视。本文选择影响结直肠癌血管生成的3对负相关因子,①血管内皮生长因子(VEGF)与内皮抑素(endostatin, ES); ②血管生成素(angiopoietin, ANG)与血管抑素(angio-statin, AS); ③基质金属蛋白酶-9(MMP-9)与组织金属蛋白酶抑制物(TIMP)进行研究,以求阐述结直肠癌转移的分子机制。健脾消癌方为湖南省中医药研究院附属医院蒋益兰教授经验方,临床上治疗结直肠癌术后复发转移方面取得了很好的效果^[9-10]。选择健脾消癌方进行结直肠癌干预,对其抗肿瘤作用机制进一步研究。

1 材料

1.1 动物及细胞株 SPF级BALB/C-nu裸鼠60只,雌性,4~6周龄,体质量16~20g,购自湖南斯莱克实验动物有限公司,许可证号SYXK(湘)2015-

0008,符合湖南省中医药研究院附属医院实验动物伦理委员会规定。人结肠癌细胞株HCT116购买于中国科学院细胞库,编号TCHu 99。

1.2 药物 健脾消癌方由人参10g,薏苡仁30g,半枝莲30g,重楼10g,莪术10g,郁金15g组成,在本院中药房购买,药物由湖南省中医药研究院附属医院主任药师田其学鉴定为正品。取5倍量处方,用10倍温水浸泡0.5h,加热煎2h;药渣再加8倍水煎1h,趁热过滤。将2次水煎溶液混匀、过滤,浓缩至含生药 $2.1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液。密封后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。在湖南省中医药研究院附属医院制剂室完成。

1.3 试剂 anti- β -肌动蛋白(β -actin), anti-VEGF, anti-ES, anti-ANG, anti-AS, anti-MMP-9, anti-TIMP (Santa Cruz公司,批号分别为Sc-8432, Sc-152, Sc-33499, Sc-8357, Sc-12786, Sc-6840, Sc-6832); HRP goat anti-mouse 免疫球蛋白(Ig)G, HRP goat anti-rabbit IgG (Proteintech公司,批号分别为HRP-60008, 10285-1-AP); RIPA裂解液(北京普利莱基因技术有限公司,批号C1053); 蛋白酶抑制剂(Merck公司,批号539134-1ML); 蛋白磷酸酶抑制剂(Roche公司,批号4906845001)。

1.4 仪器 TGL-18R型台式冷冻离心机(深圳黑马精品有限公司), 164-5050型电泳仪(美国Bio-Rad公司), DYCZ-40A型转膜仪(北京六一仪器厂), G:BOX型凝胶成像系统(英国Syngene公司)。

2 方法

2.1 模型制备 按文献方法^[11],于无菌环境下,用2.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉裸鼠,左下腹切开约2.5cm切口,暴露盲肠。用微量注射器将HCT116细胞 $50\text{ }\mu\text{L}$ (2×10^6 /只)注入盲肠浆膜和肌层之间,用3%碘酒清洁注射区域,缝合腹壁。接种细胞

15~20 d 后,可见裸鼠腹部有小肿块,表明肿瘤形成并开始转移。

2.2 给药 造模成功后,选 20 只裸鼠随机分为模型组、健脾消癌组,另设空白组。健脾消癌组灌胃给予 40 g·kg⁻¹[12],1 次/d;模型及空白组以生理盐水灌胃,连续给药 4 周,末次给药 2 h 后处死。动物死亡或处死后即刻打开腹腔,取肝、肺(有转移结节者以结节为中心取材)、盲肠肿瘤组织及结肠组织(盲肠上端 1 cm),液氮冷冻。测定 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 在组织中的蛋白表达水平。

2.3 蛋白测定 每组取 4 个动物标本测定,取组织 0.1 g,裂解,提取蛋白,测定蛋白浓度。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,蛋白变性后加于凝胶上样孔内,浓缩胶恒压 80 V,分离胶恒压 120 V,200 min。转膜 350 mA 恒流 90 min。将凝胶中的蛋白质通过湿转法转移至硝酸纤维素膜上,室温下用封闭液封闭

处理 1 h,经 1×TBST 缓冲液洗脱后,加入一抗 anti-β-actin (1:4 000); anti-VEGF, anti-ES, anti-ANG, anti-AS, anti-MMP-9, anti-TIMP (1:200) 于 4℃ 条件下反应过夜,再次洗脱后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗和鼠二抗(1:3 000),于室温下平缓摇动 1 h,经 1×TBST 缓冲液洗膜 3 次后,用化学发光底物进行检测。拍照,分析蛋白条带灰度值。

2.4 统计学方法 实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性采用 *t* 检验,方差不齐采用秩和检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

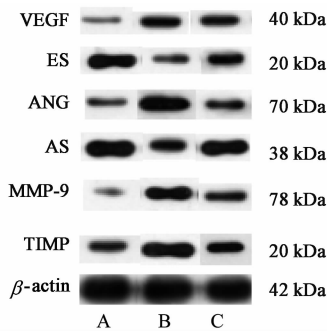
3.1 健脾消癌方对裸鼠结肠组织血管因子蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组动物结肠 VEGF, ANG, MMP-9, TIMP 明显升高,ES 明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与模型组比较,健脾消癌组结肠 MMP-9 明显降低(*P* < 0.05)。见表 1,图 1。

表 1 健脾消癌方对结肠组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Jianpi Xiaocai prescription on protein expressions of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP in colon tissues($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF/β-actin	ES/β-actin	ANG/β-actin	AS/β-actin	MMP-9/β-actin	TIMP/β-actin
空白	-	0.242 ± 0.037	0.735 ± 0.031	0.259 ± 0.047	0.842 ± 0.065	0.188 ± 0.019	0.410 ± 0.049
模型	-	0.568 ± 0.055 ²⁾	0.387 ± 0.029 ²⁾	0.681 ± 0.044 ²⁾	0.598 ± 0.035	0.700 ± 0.034 ²⁾	0.831 ± 0.061 ²⁾
健脾消癌方	40	0.570 ± 0.125 ²⁾	0.595 ± 0.034 ³⁾	0.487 ± 0.077	0.714 ± 0.029	0.438 ± 0.038 ^{2,3)}	0.635 ± 0.116

注:与空白组比较¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01;与模型组比较³⁾*P* < 0.05, ⁴⁾*P* < 0.01(表 2~4 同)。



A. 空白组;B. 模型组;C. 健脾消癌方组(图 2~4 同)

图 1 健脾消癌方作用裸鼠结肠组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP proteins in colon tissues of nude mice

3.2 健脾消癌方对裸鼠盲肠肿瘤组织血管因子蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组裸鼠肿瘤 VEGF, ANG, MMP-9, TIMP 显著升高,ES, AS 明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与模型组比较,健脾消癌组肿瘤 TIMP 明显降低(*P* < 0.05)。见表 2,图 2。

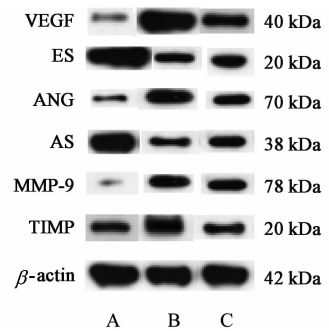


图 2 健脾消癌方作用裸鼠肿瘤组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP proteins in tumor tissues of nude mice

3.3 健脾消癌方对裸鼠肝组织血管因子蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组动物肝组织 VEGF, ANG, MMP-9, TIMP 显著升高(*P* < 0.01),ES, AS 明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与模型组比较,健脾消癌组肝组织 ANG, MMP-9 明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 3,图 3。

表 2 健脾消癌方对肿瘤组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Jianpi Xiaocai prescription on protein expressions of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP in tumor tissues ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	VEGF/ β -actin	ES/ β -actin	ANG/ β -actin	AS/ β -actin	MMP-9/ β -actin	TIMP/ β -actin
空白	-	0.297 ± 0.033	0.753 ± 0.039	0.321 ± 0.031	0.796 ± 0.044	0.186 ± 0.013	0.331 ± 0.037
模型	-	0.772 ± 0.057 ²⁾	0.472 ± 0.054 ¹⁾	0.690 ± 0.040 ²⁾	0.458 ± 0.022 ²⁾	0.685 ± 0.040 ²⁾	0.671 ± 0.034 ²⁾
健脾消癌方	40	0.485 ± 0.052 ³⁾	0.679 ± 0.028	0.472 ± 0.044	0.498 ± 0.042 ¹⁾	0.472 ± 0.025 ²⁾	0.416 ± 0.026 ³⁾

表 3 健脾消癌方对肝组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Jianpi Xiaocai prescription on protein expressions of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP in liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	VEGF/ β -actin	ES/ β -actin	ANG/ β -actin	AS/ β -actin	MMP-9/ β -actin	TIMP/ β -actin
空白	-	0.253 ± 0.052	0.773 ± 0.038	0.214 ± 0.032	0.802 ± 0.043	0.182 ± 0.016	0.389 ± 0.024
模型	-	0.777 ± 0.027 ²⁾	0.519 ± 0.090 ¹⁾	0.662 ± 0.043 ²⁾	0.434 ± 0.087 ²⁾	0.741 ± 0.042 ²⁾	0.721 ± 0.046 ²⁾
健脾消癌方	40	0.635 ± 0.036 ²⁾	0.791 ± 0.025	0.381 ± 0.063 ³⁾	0.735 ± 0.047	0.264 ± 0.040 ⁴⁾	0.547 ± 0.109

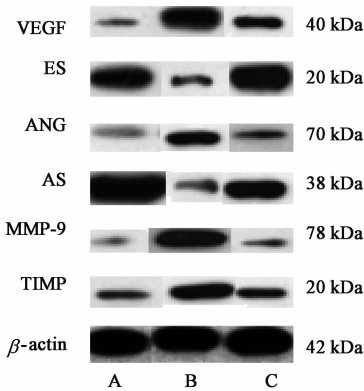


图 3 健脾消癌方作用裸鼠肝组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP in liver tissues of nude mice

3.4 健脾消癌方对裸鼠肺组织血管因子蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组动物肺组织 VEGF, MMP-9, TIMP 显著升高, ES, AS 显著降低 ($P <$

0.01)。与模型组比较,健脾消癌组肺组织 VEGF 显著降低, AS 显著升高 ($P < 0.01$)。见表 4, 图 4。

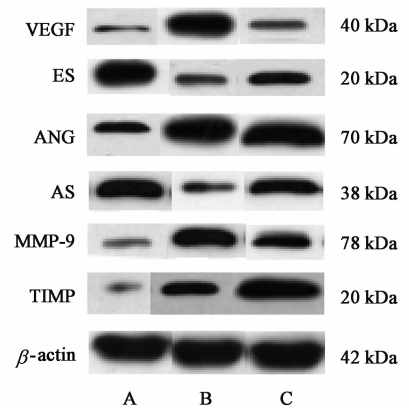


图 4 健脾消癌方作用裸鼠肺组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein expressions of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP in lung tissues of nude mice

表 4 健脾消癌方对肺组织 VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9, TIMP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Jianpi Xiaocai prescription on protein expressions of VEGF, ES, ANG, AS, MMP-9 and TIMP in lung tissues ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	VEGF/ β -actin	ES/ β -actin	ANG/ β -actin	AS/ β -actin	MMP-9/ β -actin	TIMP/ β -actin
空白	-	0.278 ± 0.037	0.795 ± 0.025	0.564 ± 0.037	0.778 ± 0.027	0.287 ± 0.025	0.242 ± 0.032
模型	-	0.786 ± 0.028 ²⁾	0.452 ± 0.039 ²⁾	0.779 ± 0.027	0.454 ± 0.038 ²⁾	0.763 ± 0.032 ²⁾	0.645 ± 0.027 ²⁾
健脾消癌方	40	0.402 ± 0.061 ⁴⁾	0.650 ± 0.028	0.692 ± 0.082	0.762 ± 0.033 ⁴⁾	0.687 ± 0.025 ²⁾	0.585 ± 0.145 ²⁾

4 讨论

血管形成受血管生成因子与抗血管生成因子所调控。肿瘤生长或伤口愈合时,血管生成因子占主导,血管内皮细胞被激活,进而增殖、迁移和成管^[13]。研究表明,结直肠癌转移患者采用 VEGF 抑制剂靶向治疗很快耐药或无效,其原因是患者处于高脂肪合成、高氧化磷酸化状态^[14]。来源于胶原蛋

白的血管 ES 具有肿瘤血管生成抑制作用,一些癌症包括结直肠癌,其血液中 ES 浓度升高,肿瘤组织中 ES 未见升高^[15]。这种情况往往使临床治疗非常困惑。

ANG 是一种分泌型核糖核酸酶,有 ANG1, ANG2, ANG3, ANG4。研究表明,ANG 作用于内皮细胞引起血管新生,尤其在人胃癌、肝癌、乳腺癌和

胶质细胞瘤等均表达增加^[16]。但也有报道 ANG1 抑制小鼠玻璃体内新生血管形成^[17]。AS 是迄今发现的最有效的血管生成抑制剂之一,它可能通过影响内皮细胞增殖、凋亡、迁移,抑制毛细血管芽生,从而抑制肿瘤新生血管和眼部新生血管^[18]。

MMP 是一组锌离子依赖性蛋白水解酶,一方面 MMP 降解细胞外基质和血管基质膜,促进血管内皮细胞存活和肿瘤释放血管生长因子;另一方面, MMP 的激活可释放血管形成抑制因子。MMP-9 是 MMP 群中较突出的一种,是结直肠癌新生血管的必要因素。MMP-9 持续高表达,VEGF 及其受体也相应增加,直肠癌细胞的转移侵袭增加^[19]。TIMP 为 MMP 特异性天然抑制剂,至少有 4 个成员,其中 TIMP-1, TIMP-2 最常见。TIMP 能与 MMP 以 1:1 非共价键结合,抑制 MMP 活性。研究表明,在结直肠癌后期, MMP 与 TIMP 平衡破坏, MMP 增加, TIMP 减少,肿瘤转移性增加^[20]。

机体血管生成是一个复杂体系,虽然本文检测了一系列的血管生成因子,也得到了与理论比较相近的结果,但与临床还是有一定的差距。本实验结果显示, HCT116 结直肠癌模型裸鼠的结肠、肝、肺与肿瘤组织的 VEGF, MMP-9, ANG 升高, ES, AS 降低。与文献明显不同的是 TIMP 升高,这可能是机体为了达到 MMP 与 TIMP 平衡的缘故。另外,中药健脾消癌方在之前的研究中发现呈剂量依赖性的抑制裸鼠人结肠癌皮下移植瘤的生长,也能显著降低裸鼠血清中 VEGF 表达水平^[12],在临床中有效的降低了结直肠癌患者的术后转移率,但是作用机制的研究尚不完善。本实验研究结果显示健脾消癌方有明显改善血管因子释放的作用,对结肠 MMP-9, 肿瘤 TIMP, 肝组织 ANG, MMP-9 及肺组织 VEGF, AS 有影响,总体上比较全面地改善了机体抗肿瘤血管生成的能力,但对不同组织的作用有差异,这些差异是否就是中医复方的作用特点,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] WANG G, YANG X, LI C, et al. PIK3R3 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes metastasis in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(7): 1837-1847.

[2] 路星星. TRAF6 抑制结直肠癌转移通过调控 β -catenin 信号[D]. 苏州:苏州大学, 2016.

[3] 马瑞, 徐玲, 曲秀娟, 等. 结直肠癌的中药治疗进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(10): 2217-2219.

[4] 刘帅. Vasohibin1 对结肠癌血管生成调控和肿瘤细胞

抑制功能的临床和分子机制研究[D]. 济南:山东大学, 2015.

[5] 陈娇, 徐为人. 抗肿瘤血管新药的研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(1): 1-5.

[6] 潘昊. 肿瘤血管生成及抗血管生成的临床应用[J]. *中国医药工业杂志*, 2006, 37(2): 133-136.

[7] 张百红, 岳红云. 抗肿瘤靶向药物的分类[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(2): 299-303.

[8] 庞琳, 杨生生. 抗肿瘤药物热门靶点研究进展[J]. *生命的化学*, 2017, 37(2): 217-221.

[9] 蒋益兰, 俞天俊, 赵晔. 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(3): 94-96.

[10] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌的临床研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(5): 1732-1736.

[11] Céspedes M V, Espina C, García-Cabezas M A, et al. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(3): 1077-1085.

[12] 王容容, 陈州华, 王其美, 等. 健脾消癌方对人大肠癌裸鼠皮下移植瘤微血管生成的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 4150-4153.

[13] 黄文. 血管内皮抑素抗肿瘤研究进展综述[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(4): 253-255.

[14] Pommier A J, Farren M, Patel B, et al. Leptin, BMI, and a metabolic gene expression signature associated with clinical outcome to VEGF inhibition in colorectal cancer [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 77-93.

[15] Kantola T, Väyrynen J P, Klintrup K, et al. Serum endostatin levels are elevated in colorectal cancer and correlate with invasion and systemic inflammatory markers[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(8): 1605-1613.

[16] 王新刚, 吴攀, 韩春茂. 血管生成素促进血管新生机制及其应用研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2015, 31(6): 473-475.

[17] 张翀, 陈蕾, 李婷婷. 血管生成素-1 对小鼠视网膜新生血管和血管内皮生长因子的抑制作用[J]. *眼科新进展*, 2015, 35(1): 31-34.

[18] 曾静, 谭毅. 血管抑素对新生血管的作用及其机制研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2014, 7(7): 663-666.

[19] 杨昀, 蒋永来, 季国忠. 基质金属蛋白酶与大肠癌侵袭和转移关系的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(7): 771-773.

[20] 张瑜红, 谭至柔, 黄雪, 等. 基质金属蛋白酶-2 及组织抑制因子在结肠腺瘤癌变过程中的表达及意义[J]. *微创医学*, 2015, 10(3): 290-292.

[责任编辑 张丰丰]