doi:10.11659/jjssx.11E019108

·基础研究·

贝伐单抗对视网膜母细胞瘤荷瘤裸鼠的影响及机制探讨

刘 法[1],郝 静[1],陈志杰[1],刘洪涛[1],王明坤[2] (1.哈尔滨市二四二医院眼科,黑龙江 哈尔滨 150036;2.哈尔滨医科大学附属医院眼科,黑龙江 哈尔滨 150007)

[摘 要] **目的** 探究贝伐单抗(BCM)对视网膜母细胞瘤荷瘤裸鼠的影响及机制。**方法** 将60只SPF级雄性裸鼠皮下注射5×10^6个SO-RB_{50}细胞,建立视网膜母细胞移植瘤裸鼠模型,然后随机分成模型组、BCM低剂量组(腹腔注射BCM 10 mg/kg)、BCM高剂量组(腹腔注射BCM 50 mg/kg),每组20只。记录肿瘤体积和裸鼠存活率;TUNEL染色观察肿瘤组织细胞凋亡情况;免疫组化检测Ki-67和血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平;Western blot检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和蛋白激酶B(AKT)的磷酸化水平。**结果** 与模型组相比,BCM低剂量组和BCM高剂量组肿瘤体积较小,荷瘤裸鼠的存活率和肿瘤组织细胞凋亡率较高,Ki-67和VEGF的表达水平较低,p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的比值显著较低,且BCM浓度越高效果越明显。**结论** 贝伐单抗可抑制肿瘤细胞增殖和PI3K/AKT信号通路的激活,诱导肿瘤组织细胞凋亡,提高视网膜母细胞瘤裸鼠的存活率。

[关键词] 贝伐单抗;视网膜母细胞瘤;增殖;凋亡;Ki-67;VEGF

[中图分类号] R739.7 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-11-20

Effect of Bevacizumab on retinoblastoma-bearing nude mice and its mechanism

LIU Fa[1], HAO Jing[1], CHEN Zhi-jie[1], LIU Hong-tao[1], WANG Ming-kun[2] (1. Department of Ophthalmology, Harbin 242 Hospital, Harbin Heilongjiang 150036 China; 2. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang 150037, China)

Abstract: Objective To explore the effect of Bevacizumab (BCM) retinoblastoma-bearing on nude mice and its mechanism. **Methods** Totally 60 SPF nude mice were injected subcutaneously with 5×10^6 SO-RB50 cells to establish the retinoblastoma model and they were randomly divided into the model group, BCM low-dosage group (10 mg/kg of BCM intra-peritonelly) and BCM high-dosage group (50 mg/kg of BCM intra-peritonelly), with 20 mice in each group. The tumor volume and the survival rate of nude mice were recorded. TUNEL staining was used to observe the cell apoptosis of tumor tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of Ki-67 and vascular endothelial growth factor (VEGF), and Western blot was used to detect the levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT). **Results** Compared with the model group, the tumor volume of the BCM low-dosage group and the BCM high-dosage group were smaller, the survival rate of the tumor-bearing nude mice and the apoptosis rate of the tumor tissue were higher, the expression levels of Ki-67 and VEGF in the tumor tissue were lower, the ratio of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT were lower, and the effect was more obvious with the higher BCM concentration. **Conclusion** Bevacizumab can inhibit the proliferation of tumor cell and the activation of PI3K/AKT signaling pathway, induce the apoptosis of tumor tissue cell and improve the survival rate of nude mice with retinoblastoma.

Keywords: bevacizumab; retinoblastoma; proliferation; apoptosis; Ki-67; VEGF

[基金项目] 黑龙江省卫生计生委科研计划项目(2018163)

[16] Yang Y, Cai Y, Zhang Y, et al. Exosomes secreted by adipose-derived stem cells contribute to angiogenesis of brain microvascular endothelial cells following oxygen-glucose deprivation in vitro through microrna-181b/trpm7 axis[J]. J Mol Neurosci, 2018, 65(1): 74-83. doi: 10.1007/s12031-018-1071-9.

[17] 黎洪棉,柳大烈,余元龙,等. 自体PRP促进人脂肪来源干细胞成骨分化的体外实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(6): 732-736. doi: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.002.

[18] Luo Y, Cao X, Chen J, et al. MicroRNA-224 suppresses osteoblast differentiation by inhibiting SMAD4[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 6929-6937. doi: 10.1002/jcp.26596.

[19] Hu S, Mao G, Zhang Z, et al. MicroRNA-320c inhibits development of osteoarthritis through downregulation of canonical Wnt signaling pathway[J]. Life Sci, 2019, 228: 242-250. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.011.

[20] Ma X, Fan C, Wang Y, et al. MiR-137 knockdown promotes the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells via the LSD1/BMP2/SMAD4 signaling network[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 909-919. doi: 10.1002/jcp.29006.

[21] Li H, Fan J, Fan L, et al. MiRNA-10b reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis partly through the tgf-beta/smad2 signaling pathway[J]. Aging Dis, 2018, 9(6): 1058-1073. doi: 10.14336/AD.2018.0214.

(编辑:刘 艺)

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma,Rb)是一种常见于婴幼儿的原发性眼内恶性肿瘤[1]。目前治疗视网膜母细胞瘤的方法主要有放射性疗法、温热疗法、视网膜摘除等[2]。化疗药物能够取得良好的治疗效果,避免了眼球摘除手术,大幅提高了视网膜母细胞瘤患者的生存率,故化疗逐渐成为了治疗眼内视网膜母细胞瘤的一线疗法[3]。然而化疗药物通常会造成全身性的毒副作用,长期接触大剂量的化疗药物容易诱发继发性白血病[4];且在肿瘤治疗后期,由于肿瘤的抗药性,疗效会越来越差[5]。因此,寻找毒性低、疗效好的治疗视网膜母细胞瘤的方法具有重要意义。贝伐单抗(Bevacizumab,BCM)又称阿瓦斯汀,是一种血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)抗体,有研究发现其可抵抗肿瘤生长[6-7]。贝伐单抗于2004年在美国获得批准,成为第一个临床使用的血管生成抑制剂,用于联合化疗和转移性结肠癌的标准化疗[8]。此后,贝伐单抗又被批准用于某些肺癌、肾癌、卵巢癌和多形性胶质母细胞瘤的治疗[9]。近年来,关于贝伐单抗抑制肿瘤生长的研究日渐增多,但是贝伐单抗治疗视网膜母细胞瘤的相关研究还较少,故本研究通过分析贝伐单抗对视网膜母细胞瘤裸鼠的影响及其相关分子机制,以期为视网膜母细胞瘤的治疗提供相关参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

SPF级雄性裸鼠60只(6周龄,体质量16~20 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司;视网膜母细胞瘤SO-RB_{50}细胞购自美国ATCC;贝伐单抗购自瀚香生物科技有限公司;RPMI-1640细胞培养基、FBS和青霉素/链霉素溶液购自美国Hyclone;TUNEL染色试剂盒购自Roche公司;Ki-67、VEGF、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)、AKT、p-PI3K和p-AKT兔抗人一抗购自Abcam;山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司;免疫组化试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将视网膜母细胞瘤SO-RB_{50}细胞接种于RPMI-1640培养基(10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素),于含5% CO_2的37 ℃生化培养箱中培养。

1.2.2 视网膜母细胞瘤裸鼠模型构建及分组 实验前裸鼠在室温26~28 ℃、湿度40%~60%、每天10 h光照循环的条件下适应环境1周。取对数生长期的SO-RB_{50}细胞,调整细胞密度为5×10^7个/mL,裸鼠右侧皮下注射0.1 mL细胞悬液,建立视网膜母细胞移植瘤裸鼠模型,每天观察肿瘤生长情况,当肿瘤长出后通过游标卡尺测量肿瘤体积,本研究所有裸鼠模型均建立成功。将60只模型鼠随机分成模型组、BCM低剂量组(BCM 10 mg/kg)、BCM高剂量组(BCM 50 mg/kg),每组20只;在皮下接种SO-RB_{50}细胞4 d后,根据预实验结果,BCM低剂量组和BCM高剂量组裸鼠分别以10 mg/kg和50 mg/kg剂量每2周1次腹腔注射给予BCM,连续4周,模型组裸鼠腹腔注射等体积生理盐水。

1.2.3 肿瘤体积测量 游标卡尺测量皮下肿块的长径(a)和短径(b),肿瘤体积$V=a\times b^2/2$,每隔5 d测量1次。

1.2.4 TUNEL染色观察肿瘤组织细胞凋亡情况 在用药30 d后脱臼处死小鼠,分离肿瘤组织,取部分肿瘤组织用10%中性福尔马林固定。常规方法将石蜡包埋的组织切片脱蜡至水。室温下PBS洗涤3次,每次5 min;加20%牛血清室温下孵育30 min。将混合好的TUNEL染色液加在切片上,37 ℃孵育90 min,室温下PBS洗涤3次,每次5 min;用含3%过氧化氢的甲醇阻断10 min,加转化剂于37 ℃温育30 min,PBS洗涤3次,每次5 min;DAB显色后苏木精复染,常规脱水、透明、中性树脂封固。荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 免疫组化检测Ki-67和VEGF表达水平 石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢封闭,蒸馏水洗2次,每次5 min,抗原修复,PBS洗2次,每次5 min;滴加山羊血清封闭,滴加一抗,37 ℃孵育2 h,PBS清洗;加生物素化的二抗,37 ℃孵育30 min,PBS清洗;加SAB复合物,37 ℃孵育30 min,PBS清洗;DAB显色,光学显微镜下观察并拍照。

1.2.6 Western blot检测PI3K和蛋白激酶B(AKT)的磷酸化水平 取肿瘤组织,冰上剪碎,加含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,冰上裂解。离心后,BSA法检测蛋白浓度,制作凝胶蛋白样品。12%的变性凝胶分离蛋白样品,其中浓缩胶电流控制在15~20 mA,约15 min后溴酚蓝指示剂到达分离胶,随后电流升至30~45 mA,电泳1~2 h,待溴酚蓝指示剂距前沿1~2 cm处时停止电泳,以200 mA转膜100 min,于含5%脱脂牛奶的TBST室温封闭1 h,加一抗(1∶4 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗涤3次,每次5 min;加二抗(1∶2 000)室温下孵育2 h,TBST洗涤3次,每次5 min。加显影液于凝胶成像系统中定影并拍照,使用Image-Pro plus 6.0软件分析蛋白条带灰度。

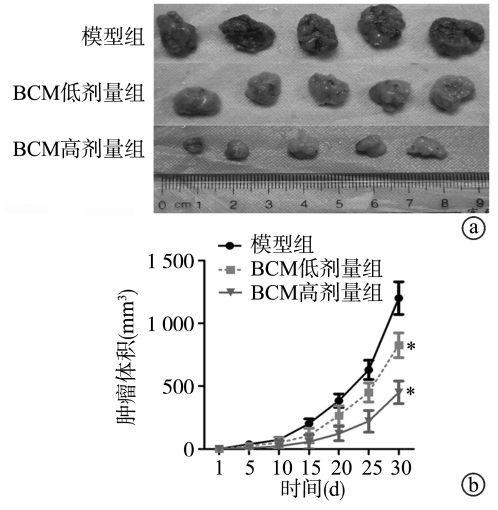
1.3 统计学处理

所有数据应用SPSS 18.0软件进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用独立t检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用snk-q检验,$P<0.05$为差异有统计学意义$P<0.01$为差异具有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 贝伐单抗抑制视网膜母细胞瘤生长

在用药30 d后,BCM低剂量组和BCM高剂量组肿瘤体积明显小于模型组,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图1。实验结果表明,贝伐单抗能抑制视网膜母细胞瘤的生长,且BCM给药的浓度越高,效果越明显。

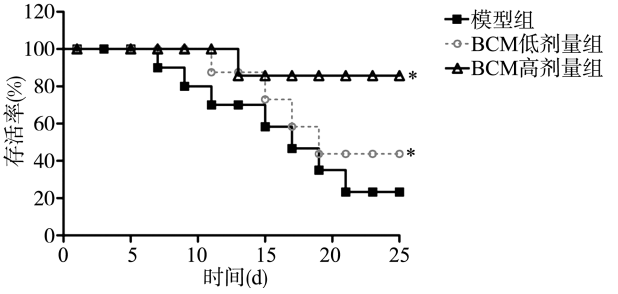


a:视网膜母细胞瘤;b:肿瘤体积 *:与模型组比较,$P<0.01$

图1 贝伐单抗对视网膜母细胞瘤裸鼠体内肿瘤生长的影响

2.2 贝伐单抗提高视网膜母细胞瘤裸鼠的存活率

BCM低剂量组荷瘤裸鼠存活率在用药后25 d约为40%,明显高于模型组。BCM高剂量组荷瘤裸鼠只在第13天出现死亡,给药后25 d荷瘤裸鼠存活率明显高于模型组(图2)。实验结果表明,贝伐单抗能显著提高视网膜母细胞瘤裸鼠的存活率。



*:与模型组比较,$P<0.01$

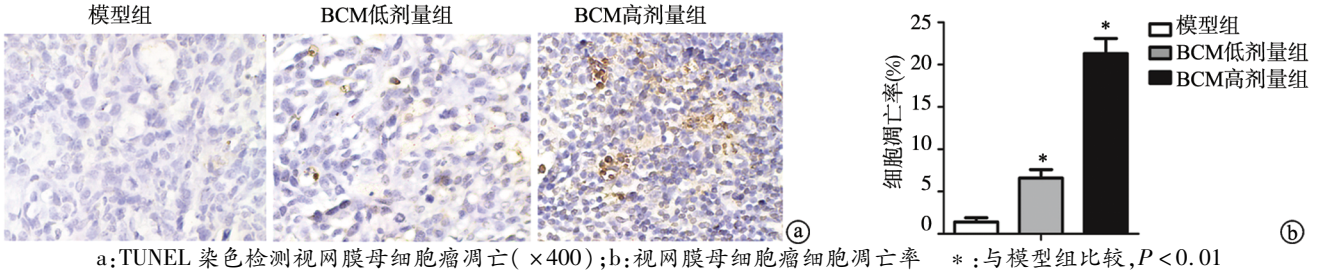
图2 贝伐单抗对视网膜母细胞瘤裸鼠存活率的影响

2.3 贝伐单抗促进视网膜母细胞瘤细胞凋亡

TUNEL结果显示,与模型组相比,BCM低剂量组和BCM高剂量组检测为凋亡阳性的细胞明显增多,差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图3。实验结果表明,贝伐单抗呈剂量依赖性促进视网膜母细胞瘤的细胞凋亡。

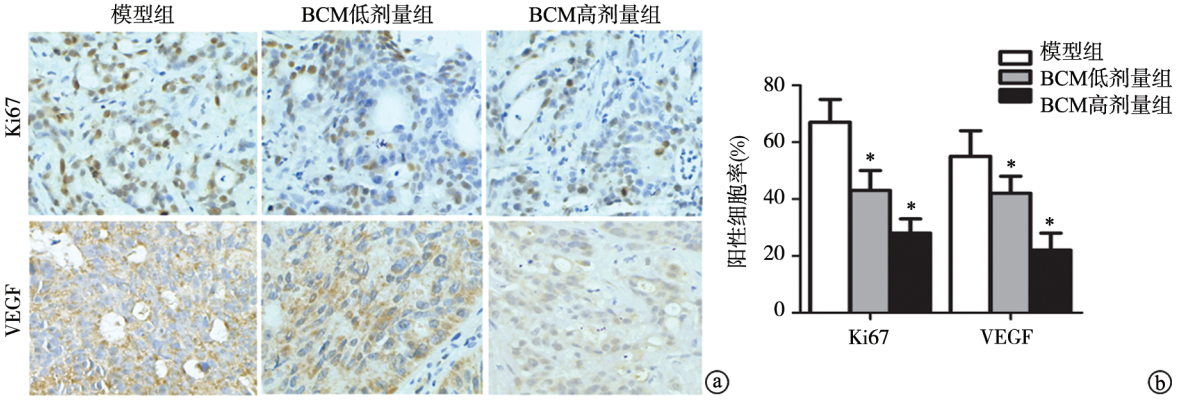
2.4 贝伐单抗抑制视网膜母细胞瘤Ki-67和VEGF表达

与模型组相比,BCM低剂量组和BCM高剂量组肿瘤组织切片中Ki-67和VEGF阳性细胞显著减少,且BCM高剂量组相比于BCM低剂量组Ki-67和VEGF阳性细胞进一步减少($P<0.01$),见图4。实验结果表明,贝伐单抗可抑制视网膜母细胞瘤实体瘤中Ki-67和VEGF的表达。



a:TUNEL染色检测视网膜母细胞瘤凋亡(×400);b:视网膜母细胞瘤细胞凋亡率 *:与模型组比较,$P<0.01$

图3 贝伐单抗对视网膜母细胞瘤细胞凋亡的影响

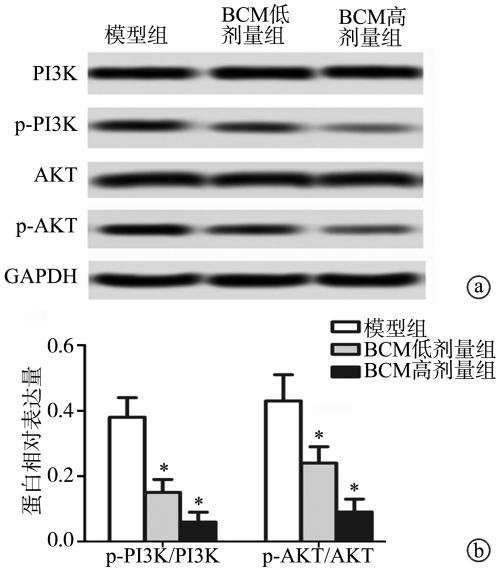


a:免疫组化检测视网膜母细胞瘤Ki67和VEGF表达(×400);b:各组Ki67和VEGF阳性细胞率 *:与模型组比较,$P<0.01$

图4 贝伐单抗对视网膜母细胞瘤Ki-67和VEGF表达的影响

2.5 贝伐单抗抑制视网膜母细胞瘤 PI3K 和 AKT 的激活

与模型组相比,BCM 低剂量组和 BCM 高剂量组肿瘤组织中 PI3K 和 AKT 表达总量差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5a;与模型组比较,BCM 低剂量组和 BCM 高剂量组肿瘤组织中磷酸化 PI3K 和磷酸化 AKT 的含量显著较低,且 BCM 高剂量组低于 BCM 低剂量组($P<0.01$),见图 5b。实验结果表明,贝伐单抗可抑制视网膜母细胞瘤 PI3K 和 AKT 的激活。



a:Western blot 检测 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化电泳图;b:PI3K 和 AKT 蛋白及其磷酸化相对表达量 *:与模型组比较,$P<0.01$

图 5 贝伐单抗对视网膜母细胞瘤 PI3K 和 AKT 表达的影响

3 讨论

视网膜母细胞瘤是常见于婴幼儿的恶性肿瘤,每 16 000~18 000 例活产儿中就有 1 例发生视网膜母细胞瘤,对新生儿眼部健康和生命造成严重威胁[10]。贝伐单抗是一种 VEGF 抗体,已被证明可在体外影响视网膜母细胞瘤细胞的生长和分化[11]。在晚期视网膜母细胞瘤中,扩散的肿瘤细胞暴露于低氧和营养缺乏的环境中会刺激肿瘤细胞分泌更多的 VEGF[12]。因此,猜测抗 VEGF 疗法在晚期视网膜母细胞瘤中可能具有重要的治疗作用。本研究结果显示,贝伐单抗能显著提高视网膜母细胞瘤裸鼠的生存率,并抑制视网膜母细胞瘤裸鼠肿瘤的生长。

细胞凋亡是一系列基因控制下细胞主动参与的一种程序性死亡,用以维持机体内环境的稳定。研究表明,细胞凋亡受阻会造成细胞正常增殖、分化和凋亡调控紊乱,是癌症发生的基础之一[13-14]。贝伐单抗的抑癌作用与其对细胞凋亡的调控作用有关。Ramezani 等[15]的研究发现,哌立福辛可通过靶向抑制 PI3K/AKT 信号通路,促进贝伐单抗在胶质母细胞移植瘤中诱导的细胞凋亡,提高治疗效果;Yazıcı 等[16]的研究结果显示,用硒处理人骨细胞样细胞株,可以降低贝伐单抗诱导的细胞凋亡和氧化应激。本研究发现,视网膜母细胞瘤荷瘤裸鼠经贝伐单抗作用后,肿瘤组织中凋亡细胞数目明显增加,结果表明贝伐单抗能够促进视网膜母细胞瘤细胞凋亡的发生,与以上研究结果一致。Ki-67 抗原是一种与细胞增殖相关的核蛋白,与核糖体 RNA 转录相关。在细胞周期 G1、S 和 G2 期,Ki-67表达逐渐增高,G0 期不表达[17-18]。在肿瘤细胞增殖活性的检测中,Ki-67 是最可靠的指标之一[19]。VEGF 是高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,与肿瘤迁移密切相关[20]。有研究证明,贝伐单抗能够抑制细胞的增殖,下调 VEGF,如 Rusovici 等[21]研究发现,贝伐单抗可通过调节细胞周期抑制血管内皮细胞增殖;Dinç 等[22]研究发现,贝伐单抗可以透过血视网膜屏障,在远端肝和血清中下调 VEGF 的表达。本研究结果显示,贝伐单抗能抑制视网膜母细胞瘤肿瘤组织中 Ki-67 和 VEGF 的表达,与以上研究结果一致。

PI3K/AKT 信号通路参与细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节。在肿瘤的治疗过程中,常常将 PI3K/AKT 作为潜在的作用靶点[23]。已有文献报道贝伐单抗通过调控 PI3K/AKT 通路发挥抑癌作用,如曾小芳等[24]发现,抑制 PI3K/AKT 通路的激活能抑制卵巢癌细胞增殖和转移;Zhang 等[12]研究发现,在体内和体外模型中,贝伐单抗和卡铂通过抑制 ERK1/2 和 AKT 信号通路,进而抑制人视网膜母细胞瘤增殖;Mahfouz 等[25]研究发现,贝伐单抗通过抑制 PI3K/AKT、HIF-1 和 VEGF,激活胃肠道肿瘤细胞 VEGF 的自主调节机制。本研究结果显示,贝伐单抗抑制视网膜母细胞瘤 PI3K 和 AKT 的激活,表明贝伐单抗对视网膜母细胞瘤的抑制作用与抑制 PI3K/AKT 通路有关。

综上所述,贝伐单抗能够降低视网膜母细胞瘤裸鼠的死亡率,抑制视网膜母细胞瘤增殖、促进细胞凋亡,同时抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活。贝伐单抗是否通过调控 PI3K/AKT 信号通路激活,进而抑制视网膜母细胞瘤的生长和增殖,还需要进一步的实验验证。

[参考文献]

[1] Rodriguez-Galindo C, Orbach DB, VanderVeen D. Retinoblastoma[J]. Pediatr Clin North Am, 2015, 62(1): 201-223. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.014.

[2] Lumbroso-Le Rouic L, Savignoni A, Levy-Gabriel C, et al. Treatment of retinoblastoma: the institut curie experience on a series of 730 patients (1995 to 2009)[J]. J Fr Ophtalmol, 2015, 38(6): 535 - 541. doi: 10.1016/j.jfo.2015.04.002.

[3] Mendoza PR, Grossniklaus HE. The biology of retinoblastoma[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 134: 503 - 516. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.012.

[4] Jehanne M, Brisse H, Gauthier-Villars M, et al. Retinoblastoma: recent advances[J]. Bull cancer, 2014, 101(4): 380 - 387. doi: 10.1684/bdc.2014.1931.

[5] Grossniklaus HE. Retinoblastoma. Fifty years of progress. The LXXI Edward Jackson memorial lecture[J]. Am J Ophthalmol, 2014, 158(5): 875 - 891. doi: 10.1016/j.ajo.2014.07.025.

[6] Keating GM. Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer[J]. Drugs, 2014, 74(16): 1891 - 1925. doi: 10.1007/s40265 - 014 - 0302 - 9.

[7] Castro BA, Aghi MK. Bevacizumab for glioblastoma: current indications, surgical implications, and future directions[J]. Neurosurg Focus, 2014, 37(6): E9. doi: 10.3171/2014.9.focus14516.

[8] Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(6): 385 - 403. doi: 10.1038/nrd.2015.17.

[9] Aravantinos G, Pectasides D. Bevacizumab in combination with chemotherapy for the treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review[J]. J Ovarian Res, 2014, 7: 57. doi: 10.1186/1757 - 2215 - 7 - 57.

[10] Broaddus E, Topham A, Singh AD. Incidence of retinoblastoma in the USA: 1975 - 2004[J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93(1): 21 - 23. doi: 10.1136/bjo.2008.138750.

[11] Heo JW, Kim JH, Cho CS, et al. Inhibitory activity of bevacizumab to differentiation of retinoblastoma cells[J]. PloS One, 2012, 7(3): e33456. doi: 10.1371/journal.pone.0033456.

[12] Zhang Q, Cheng Y, Huang L, et al. Inhibitory effect of carboplatin in combination with bevacizumab on human retinoblastoma in an in vitro and in vivo model[J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 5326 - 5332. doi: 10.3892/ol.2017.6827.

[13] Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies[J]. Leuk Lymphoma, 2014, 55(9): 1980 - 1992. doi: 10.3109/10428194.2013.855307.

[14] 楚广民,张建波,孙森森. RNA 干扰沉默 SOX9 对肾细胞癌 786-O 细胞体外增殖、凋亡及裸鼠成瘤能力的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3): 174 - 179. doi: 10.3969/j.issn.1674 - 6929.2018.03.007.

[15] Ramezani S, Vousooghi N, Ramezani Kapourchali F, et al. Perifosine enhances bevacizumab-induced apoptosis and therapeutic efficacy by targeting PI3K/AKT pathway in a glioblastoma heterotopic model[J]. Apoptosis, 2017, 22(8): 1025 - 1034. doi: 10.1007/s10495 - 017 - 1382 - 2.

[16] Yazıcı T, Koçer G, Nazıroğlu M, et al. Zoledronic acid, bevacizumab and dexamethasone-induced apoptosis, mitochondrial oxidative stress, and calcium signaling are decreased in human osteoblast-like cell line by selenium treatment[J]. Biol Trace Elem Res, 2017, 184(2): 358 - 368. doi: 10.1007/s12011 - 017 - 1187 - 8.

[17] Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2013, 66(6): 512 - 516. doi: 10.1136/jclinpath - 2012 - 201085.

[18] Li LT, Jiang G, Chen Q, et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review)[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 1566 - 1572. doi: 10.3892/mmr.2014.2914.

[19] Zhou Y, Hu W, Chen P, et al. Ki67 is a biological marker of malignant risk of gastrointestinal stromal tumors: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(34): e7911. doi: 10.1097/MD.0000000000007911.

[20] Costache MI, Ioana M, Iordache S, et al. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature[J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(3): 199 - 208. doi: 10.1515/rjim - 2015 - 0027.

[21] Rusovici R, Patel CJ, Chalam KV. Bevacizumab inhibits proliferation of choroidal endothelial cells by regulation of the cell cycle[J]. Clin Ophthalmol, 2013, 7: 321 - 327. doi: 10.2147/OPTH.S41556.

[22] Dinç E, Ayaz L, Kurt AH. Effects of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept on microrna expression in a retinal pigment epithelium cell culture model of oxidative stress[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2018, 34(4): 346 - 353. doi: 10.1089/jop.2017.0128.

[23] Polivka J Jr, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mtor pathway[J]. Pharmacol Ther, 2014, 142(2): 164 - 175. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.004.

[24] 曾小芳,熊艳杰,乌日娜,等. 抑制 miRNA-301a 表达对卵巢癌中 SKOV3 细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(1): 92 - 94. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2018.01.023.

[25] Mahfouz N, Tahtouh R, Alaaeddine N, et al. Gastrointestinal cancer cells treatment with bevacizumab activates a VEGF autoregulatory mechanism involving telomerase catalytic subunit HTERT via PI3K-AKT, HIF-1α and VEGF receptors[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179202. doi: 10.1371/journal.pone.0179202.

(编辑:魏 源)