Nell-1 在骨组织工程中的应用及与疾病关系的研究进展

Application of Nell-1 in bone tissue engineering and advances in its relation with diseases

李 利[1,2],李力韬[1],郭乔楠[2] (第三军医大学:1. 学员旅 17 队;2. 西南医院病理学研究所,重庆 400038)

[关键词] 骨组织;Nell-1;骨肿瘤;研究进展
[中图分类号] R979.1 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2012)02-0189-04

Nell-1(neural epidermal growth factor-like 1)基因定位于染色体 11p15.1-p15.2,是一种新型生长因子,具有诱导成骨细胞分化、促进骨组织矿化,最终促进新骨质形成的作用。Nell-1 作为潜在的新型成骨基因,有更强的安全性和特异性,可能在骨组织工程中发挥作用并且有良好的开发应用前景。此外,也有研究显示 Nell-1 基因在大肠癌及 Burkitt's 淋巴瘤中有异常表达。基于 Nell-1 在成骨细胞分化和凋亡过程中发挥的调节作用,推断 Nell-1 的促进成骨细胞分化及抑制成骨细胞增殖作用在骨肉瘤等骨组织肿瘤中可能扮演抑癌基因角色。

1 Nell-1 基因及其编码蛋白的特点

Nell-1 首先由 Watanabe 等[1]分离自人胎儿脑 cDNA,它们编码包含 6 个表皮生长因子(EGF)样区域,Nell-1 基因定位于染色体 11p15.1-p15.2,Nell-1 的 cDNA 长度为 2 977 bp,包含编码 810 个氨基酸的开放性阅读框架(ORF),大鼠和人的序列具有 93% 的同源性。

Nell-1 基因编码一个 90 kDa 的多肽,其分泌蛋白以三聚体的形式存在(分子量约 400 kDa)。Nell-1 蛋白包含 1 个疏水的 N 末端信号肽、1 个 NH2 端血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1,TSP-1)样模序、1 个卷曲螺旋区、5 个血管假性血友病因子 C 结构域和 6 个 EGF 样结构域。TSP-1 作用于不同的受体、细胞因子、蛋白酶及胞外分子(如潜伏状态 TGFβ1 等),在细胞的粘附、迁移和增殖过程中起作用。TSP-1 能在细胞外结合并活化处于潜伏状态的 TGFβ1,而 TGFβ1 是破骨细胞生成及神经嵴细胞分化的一个负调节蛋白,提示 Nell-1 也可能在胞外活化 TGFβ1 超家族成员并产生相似作用。另外,有学者对 Nell-1 蛋白的 EGF 样结构域进行了研究,结果显示 Nell-1 蛋白在细胞内通过 EGF 结构与蛋白激酶 CβⅠ(PKCβⅠ)结合并被其磷酸化,Nell-1 的 EGF 样结构域与 PKC 都对碘氧基苯甲醚有特异性作用。据此他们提出 Nell-1 的 EGF 样区域可能作为 PKC 调节多个信号通路的靶点,参与细胞生长、分化、肿瘤发生及凋亡等胞内信号转导途径的假设。

2 Nell-1 在成骨方面的调控作用

2.1 Nell-1 促成骨细胞分化与骨形成

颅缝早闭,是人类常见的先天颅面畸形的一种,发病率为 1/2 500~1/3 000 个婴儿。Watanabe 等[1]最早于人脑和肾脏组织中检测到 Nell-1 极其微弱的表达,后发现 Nell-1 在颅面部骨组织中优先表达,并且在颅缝早闭(CS)患者的颅缝周围组织中发现 Nell-1 过度表达。有研究证实 Nell-1 转基因小鼠过早关闭的颅缝中有多种骨性联结表型,且 Nell-1 在成骨细胞中过表达明显促进了碱性磷酸酶和微结节形成,进而促进了成骨细胞的分化和矿化,而当 Nell-1 表达下调时体外成骨细胞的分化受到抑制。这些均提示 Nell-1 可能在颅缝闭合过程中扮演局部调节因子的作用。还有研究在 Nell-1 缺乏的小鼠模型中观察到长骨及椎体的成骨缺陷,提示 Nell-1 在脊柱及外周骨的成骨过程中也发挥着成骨作用。此外,Nell-1 还可通过体外作用于多种细胞,促进大型或小型哺乳动物骨的形成[2-4]。

Desai 等[5]利用 N-乙烷-N-亚硝基脲诱导新生小鼠 Nell-1 基因点突变获得 Nell-1(6R)突变小鼠,Nell-1(6R)基因含有一个 T-A 碱基替换使编码半胱氨酸的密码子转换成一个过早的终止密码子[Cys(502)Ter],使大部分基因编码的具有促进成骨、成软骨细胞间的黏附和细胞间通讯以及维持组织结构强度和弹性的细胞外基质(ECM),如特异型胶原、凝血酶敏感蛋白和腱蛋白等明显下降,最终导致小鼠的软骨异常、脊柱弯曲度异常、胸廓异常和头颅形态异常。说明 Nell-1 基因具有诱导成骨细胞分化、促进骨组织矿化,最终促进新骨质形成的作用。如果 Nell-1 基因的表达降低,成骨作用亦会受到抑制。

胡镜宙等[6]国内学者对 Nell-1 基因在体外骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化做了研究,他们利用腺病毒转染大鼠胫骨和股骨骨髓后分未转染组、转染 β-半乳糖苷酶(β-Galactosidase,LacZ)基因的 LacZ 组以及转染 Nell-1 基因的 Nell-1 组三个组。他们选用 ALP 作为 BMSCs 向成骨细胞分化的一个重要指标,结果显示 Nell-1 组的 ALP 含量明显高于另外两组,证实了转染 Nell-1 基因组可以提高骨髓间充质干细胞的 ALP 活性。

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金资助项目(CSTC,2009BA5009)
[作者简介] 李 利(1985-),女,山西省大同人,在读博士,主要从事肿瘤病理学方面的研究,Email:lili7667@126.com
[通讯作者] 郭乔楠,女,教授、主任医师、博士生导师,主要从事肿瘤病理学研究,电话:(023)6875443;E-mail:qiaonan85@263.net
[收稿日期] 2011-12-10 [修回日期] 2011-12-28

另外,因骨 C-羧基谷氨酸蛋白(bone C-glutamicacid-containing protein, BGP/OC)是一个高度特异性的成骨分化蛋白,其表达呈现发育阶段特异性,在细胞结节形成时开始表达,基质矿化时达到最高水平,他们将 OC 作为评估成骨细胞外基质矿化的指标,结果显示转染 Nell-1 基因组 OC 的表达和钙结节形成均明显高于另外两组,证实了 Nell-1 基因有促进 BMSCs 向成骨细胞分化的特性。总之,Nell-1 基因具有促进 BMSCs 向成骨细胞分化及促进细胞外基质矿化进而推进骨形成的作用。

2.2 Nell-1 促成骨细胞凋亡与骨形成关系

2.2.1 Fas/Fas-L 路径与 Nell-1 促成骨细胞凋亡关系 有研究提到 Fas 途径在正常成骨细胞凋亡中起重要作用,在 S252W FGFR2 Apert 颅缝早闭和尖头并指畸形综合征Ⅲ型 TWIST 单倍不足中 Tnf 和 Fas 途径参与了成骨细胞的凋亡。有报道称 Nell-1 是通过 PKC 路径发出信号诱导成骨细胞的凋亡,而激活的 PKC 会诱导 Fas-L 基因的转录[7]。Zhang 等[8]观察了出生 12.5 d 和 15.5 d 的 Nell-1 转基因小鼠的颅盖、膨出的脑组织及软颅骨中有 Fas 和/或 Fas-L 的上调,由此证实了 Fas 调节的路径是颅盖成骨细胞和脑组织的一个主要的凋亡路径。在这条路径中,Fas-L 激活了 Fas 受体从而启动一系列信号级联放大,包括 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)、受体干扰蛋白(RIP)或 Fas 死亡结构域相关蛋白(DAXX)并最终导致细胞的死亡。成骨细胞的凋亡在分化晚期开始增加,随后在矿化阶段明显增加,这说明 Nell-1 基因通过 Fas/Fas-L 路径只针对处于合适条件下的成骨细胞诱导凋亡且在成骨细胞分化的不同阶段可能扮演着不同的角色。此外,有数据显示当 Nell-1 表达适度上调时会加速成骨细胞分化以及颅缝早闭,而大量的 Nell-1 的过表达会诱导凋亡增加以及神经管缺陷,如无颅盖。说明 Nell-1 过表达在颅骨发育过程中诱导了中枢神经细胞的异常调节,从而导致了颅面发育的畸形或神经管缺陷,而这些也许是由于凋亡增加使得矿化减少、细胞迁移受到破坏。总之,Fas/Fas-L 参与 Nell-1 诱导成骨细胞凋亡为神经管缺陷的发生机制以及人类的颅面异常提供了一种新的思路。

2.2.2 APR3 与 Nell-1 促成骨细胞凋亡关系 Zou 等[9]利用 Nell-1 作为诱饵筛选出凋亡相关蛋白 3(APR3)作为 Nell-1 结合蛋白调节细胞内信号传导通路。APR3 首先在全反式维甲酸(ATRA) 治疗的 HL-60 细胞中成功克隆,是一种抑制增殖的膜蛋白,并诱导细胞分化和凋亡。APR3 过表达会阻断 G1/S 期使得细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)启动子活性显著降低,减少 Cyclin D1 在 mRNA 和蛋白质水平的表达。他们通过共聚焦显微镜首次发现了 APR3 在人类骨肉瘤细胞株 Saos2 和 U2OS 细胞以及在非肿瘤细胞株 COS-7 和 293T 细胞中分布在核膜上并通过免疫沉淀反应证实了 APR3 与 Nell-1 共同分布在核膜上且直接与 Nell-1 蛋白结合。这些成为 APR3 结合 NELL-1 作为促进成骨细胞分化同时抑制细胞增殖的一个潜在的机制。

2.3 Nell-1 对成骨细胞成骨的转录调节机制

2.3.1 Nell-1 与转录因子 Runx2/Cbfa1 关系 Runt 相关转录因子 2(Runx2/Cbfa1) 对于成骨是必不可少的。Runx2 促进下游成骨细胞基因如 a1 型胶原(Col1-a1)、骨唾液蛋白(Bsp),骨桥蛋白(Op)和骨钙素(Ocn)等基因的转录是通过结合到他们的启动子区域的成骨细胞特异性结合元素 2(OSE2)。Truong 等[10]研究发现在 Nell-1 基因的 5 侧翼区转录起点上游 2.2 kb 内 767、972 和 1 600 bp 位置上共识别 3 个成骨细胞特异性结合元件 2(OSE2)位点,Runx2 基因通过与这 3 个 OSE2 结合激活了人 Nell-1 基因启动子使得 Nell-1 基因表达上调。然而,将这 3 个 OSE2 位点分布被突变并随表达 Runx2 的质粒共转染到骨肉瘤 Sao2 细胞中。Sao2 细胞的核提取物同 3 个位点探针结合成复合物后,Nell-1 启动子的活性却显著降低了,说明 Runx2 基因在成骨细胞分化过程中起着总开关的作用。这些结果表明 Nell-1 可能是 Runx2 的一个下游调控靶点。间充质干细胞(MSC)分化为骨祖细胞需要 Runx2 的激活,Zhang 等[11]将 Nell-1(CMV-Nell-1)过表达转基因小鼠与单倍体不足的 Runx2(Runx2 +/-)小鼠杂交配种后治愈了后者的部分颅盖缺损,即 Nell-1 蛋白在 Runx2 +/-颅盖移植体中诱导了矿化和骨形成,然而在 Runx2-/-却没有出现此现象,推测 Nell-1 不仅是 Runx2 的一个下游靶点,也可能与 Runx2 在成骨方面具有协同作用。

2.3.2 Nell-1 与促丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号通路的关系 周海华等[12]曾探讨了促丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号通路在 Nell-1 介导成骨细胞分化中的作用。JNK 激酶通路参与成骨细胞分化增殖的信号转导,并且在应急、程序性细胞死亡、骨质代谢和炎症中发挥重要作用。ECM 蛋白能够与 TSP-1 等相互作用间接激活 Ras-MAPK 级联反应,再通过 Runx2 蛋白实现向成骨细胞的分化。他们根据人 Nell-1 与 TSP-1 结构域的相似性推断 Nell-1 也可能通过该路径调控成骨细胞的分化。

3 Nell-1 应用于骨组织工程研究进展

在正常情况下,成骨细胞主要是合成和向细胞外分泌各种细胞外基质(extracellular matrix,ECM),促进这些 ECM 沉积并最终形成致密的骨组织结构。骨形成蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2) 作为骨移植替代物是目前应用最广泛的成骨生长因子,但 BMP-2 在骨诱导方面存在多种副作用如促脂肪形成[13]、肿瘤形成等。另外,多数颅面缺损目前需采取骨移植或外科修补方法,自体骨移植作为治疗颅面缺损的常用手段,存在手术致畸和自体骨有限等问题。因此,随着骨组织工程技术的逐渐成熟,开发剂量可控性、对机体的副作用小以及临床可操作性强的新型促进骨形成的生长因子成为研究的热点。Aghaloo 等[14]将 Nell-1 蛋白植入鼠颅盖缺损部位显示 Nell-1 诱导骨再生的能力与 BMP-2 相当,而 Nell-1 促进细胞的矿化只针对具有成骨潜能的细胞,说明 Nell-1 相比 BMPs 的成骨作用方面在安全性和组织特异性方面更胜一筹。前面提到的 Nell-1 基因能诱导 BMSC 向成骨细胞分化并促进骨形成,使

得 Nell-1 具备了成为骨组织工程生长因子的基本条件。此外，骨组织工程生长因子的研究趋向于多生长因子的联合应用，有报道称 Nell-1 和 BMP-2 基因联合应用于骨组织工程，可以更好地促进组织工程骨的形成[15]。骨延长术（DO）被公认为一种延长骨的有效技术，但治疗周期长、结合纤维或骨折不愈合限制了它的临床应用。Zhu 等[16]将 48 只兔子的单侧胫骨延长 7 天后随机分为 4 组，分别在延长端给予标准磷酸盐缓冲液、50μg rhNell-1、50μg rhBMP-2、25μg rhBMP-2 和 25μg rhNell-1，结果显示重组人骨形成蛋白 2（rhBMP-2）与 NELL-1 分子联合治疗组的骨密度、骨矿含量、骨小梁厚度最高且骨小梁间隔最小，证实 BMP-2 和 Nell-1 联合应用增强了彼此的功效，从而明显地促进了骨愈合，同时 Nell-1 能够减少 BMP 作为成骨生长因子相关的副作用[2]，Aaron 等[13]通过研究认为 Nell-1 可以逆转大剂量 BMP-2 的促脂肪形成的作用。总之，Nell-1 与 BMP-2 联合治疗能够产生组织修复量增加、更好的组织特性及促进愈合的效果，二者联合应用可能缩短治疗周期和促进骨延长术后疗效，特别是针对那些因为年龄增长、骨质疏松症和肿瘤辐照后成骨能力下降的患者，为骨组织工程临床治疗提供了一个更好的思路。

除了 Nell-1 的成骨作用及对抗 BMP-2 相关副作用外，若要应用于临床治疗，还需要具备合适的载体和剂量可控性。目前利用软骨生长因子促进软骨修复和软骨再生的软骨组织工程是整形和外科重建多用的方法。Nell-1 是一种新型生长因子被认为具有软骨细胞系靶细胞特异性。Lee 等[17]将兔软骨细胞置于三维立体藻酸盐水凝胶微环境中培养，采用壳聚糖：TPP：CHS按 5∶1∶1 的比例将 Nell-1 包被在壳聚糖微粒中持续释放 Nell-1，结果显示包被了 Nell-1 的治疗组软骨细胞增殖和集落的形成明显增多且含有更多的 II 型胶原和粘多糖。说明 Nell-1 具有促进软骨细胞增殖和细胞外基质软骨特异性沉积的功能。通过封装或吸附到释放系统来释放 DNA、多肽和蛋白质等分子已被广泛应用。DBX 是一个商业上用于骨移植的脱钙骨基质（DBM）和透明质酸钠（作为 DBX 载体）的混合物。b-TCP，因其生物相容性和骨传导性通常被作为临床骨替代物的材料，目前已被广泛用作局部传递 BMP-2 的载体，在体内b-TCP 与透明质酸或胶原蛋白相比具有相对较慢的（46 周）吸收速度，这样延长了蛋白质传递时间使蛋白质充分发挥生物效应。Li 等[18]将 Nell-1 蛋白加载到大小为 200 ~ 300 mm b-TCP 微粒上，并将其与 DBX 混合，结果显示植入了 2.5 mg 或 5.0 mg 含有 Nell-1 载体的动物超过 75% 在术后 4 周拥有了坚固的脊柱融合。相比之下，植入不含 Nell 载体的动物有 75% 融合失败。实验结果说明 Nell-1 这个新型的生长因子被冻干加入到 b-TCP 微粒并与 DBX 混合后显著提高了大鼠的脊柱融合率。在安全的前提下，这种材料可能作为传递 Nell-1 蛋白质的骨移植材料应用于临床的脊椎融合和其他骨组织工程中，从而提高人类脊柱融合率和病人生活质量。

4 Nell-1 与疾病的关系及展望

有人发现 Nell-1 在人类所有正常造血细胞中检测不到成熟的 Nell-1 mRNA，而唯一的在前 B 细胞发育过程中的一定阶段可检测到未成熟的、未经剪切的 Nell-1 mRNA。为部分前 B 细胞白血病提供一种可能的诊断标记。启动子的超甲基化所引发的基因沉默是癌发生机制中的一个中心事件。Mori 等[19]发现 Nell-1 在结肠癌中作为新的启动子甲基化位点之一，可能扮演潜在的肿瘤抑制基因角色。近年来，研究基因异常与骨肿瘤的发生及癌细胞生物学行为的关系已是当今研究热点之一，原癌基因激活和抑癌基因失活是部分肿瘤发生的关键。骨肉瘤是原发性骨肿瘤中最常见的恶性肿瘤。由于 Nell-1 对成骨细胞的分化、凋亡有促进作用，并且抑制成骨细胞增殖，提示 Nell-1 可能在骨肉瘤等骨组织肿瘤中扮演抑癌基因的角色。所以，观察 Nell-1 基因在骨肉瘤组织以及瘤细胞中的表达水平，阐明 Nell-1 的抑癌作用并进一步探索其作用机制将是一项有意义的研究。

[参考文献]

[1] Watanabe TK, Katagiri T, Suzuki M, et al. Cloning and characterization of two novel human cDNAs (NELL1 and NELL2) encoding proteins with six EGF-like repeats[J]. Genomics, 1996, 38(3): 273 - 276.

[2] Siu RK, Lu SS, Li W, et al. Nell-1 Protein Promotes Bone Formation in a Sheep Spinal Fusion Model[J]. Tissue-Eng-Part-A, 2011, 17(7-8): 1123 - 35.

[3] Cowan CM, Cheng S, Ting K, et al. Nell-1 induced bone formation within the distracted intermaxillary suture[J]. Bone, 2006. 38(1): 48 - 58

[4] Li W, Zara JN, Siu RK, et al. Nell-1 enhances bone regeneration in a rat critical-sized femoral segmental defect model[J]. Plast-Reconstr-Surg, 2011, 127(2): 580 - 587.

[5] Desai J, Shannon ME, Johnson MD, et al. Nell1-deficient mice have reduced expression of extracellular matrix proteins causing cranial and vertebral defects[J]. Human Molecular Genetics, 2006, 15(8): 1329 - 1341.

[6] 胡镜宙，蒋欣泉，张志愿，等. Nell-1 型分子基因对大鼠骨髓基质细胞成骨分化的影响[J]. 中国口腔颌面外科杂志，2009，7(1) 38 - 43.

[7] Hay E, Lemonnier J, Fromigue O, et al. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent protein kinase C-dependent signaling pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 29028 - 29036.

[8] Zhang X, Cowan CM, Jiang X, et al. Nell-1 induces acrania-like craniosketetal deformities during mouse embryonic development. Lab Invest. 2006 Jul; 86(7): 633 - 644.

[9] Zou X, Shen J, Chen F, et al. NELL-1 binds to APR3 affecting human osteoblast proliferation and differentiation[J]. FEBS Letters, 2011, 585(15): 2401 - 2418.

[10] Truong T, Zhang X, Pathmanathan D, et al. Craniosynostosis-associat-

ed gene nell-1 is regulated by runx2[J]. J Bone Miner Res,2007,22(1):7 – 18.

[11] Zhang X,Ting K,Bessette CM,et al. Nell-1,a Key Functional Mediator of Runx2, Partially Rescues Calvarial Defects in Runx2 +/- Mice [J]. J-Bone-Miner-Res,2011,26(4):777 – 791.

[12] 周海华,李祖兵. Nel 样 1 型分子对成骨细胞分化的分子调控机制[J]. 国际口腔医学杂志,2010,37(2):166 – 169.

[13] Aaron W. James, Angel Pan, Michael Chiang, et al. A new function of Nell-1 protein in repressing adipogenic differentiation[J]. Biochemical and Biophy-sical Research Communications, 2011, 411 (1): 126 – 131.

[14] Aghaloo T, Cowan CM, Chou YF, et al. Nell-1-induced bone regeneration in calvarial defects[J]. Am J Pathol. 2006 Sep. 169(3):903 – 915.

[15] Cowan CM, Jiang X, Hsu T, et al. Synergistic effects of Nell-1 and BMP-2 on the osteogenic differentiation of myoblasts[J]. J Bone Miner Res,2007,22(6):918 – 930.

[16] Zhu SS, Song DH, Jiang XW, et al. Combined effects of recombinant human BMP-2 and Nell-1 on bone regeneration in rapid distraction osteogenesis of rabbit tibia[J]. Injury,42(12):1467 – 1473.

[17] Lee M , Siu RK , Ting K ,et al. Effect of Nell-1 Delivery on Chondrocyte Proliferation and Cartilaginous Extracellular Matrix Deposition [J]. Tissue-Eng-Part-A,2010,16(5):1791 – 1800.

[18] Li W, Lee M, Whang J,et al. Delivery of Lyophilized Nell-1 in a Rat Spinal Fusion Model[J]. Tissue-Eng-Part-A,2010,16(9):2861 – 2870.

[19] Mori Y,Cai K,Cheng Y,et al. A Genome-Wide Search Identifies Epigenetic Silencing of Somatostatin [J]. Tachykinin-1, and 5 Other Genes in Colon Cancer[J]. Gastro- enterology,2006,131(3):797 – 808.

(编辑:周小林)

(上接第 188 页)

[7] Jonker DJ,O'Callaghan CJ,Karapetis CS,et a1. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer[J]. N Engl J Med,2007,357(20): 2040 – 2048.

[8] Yeh K,Hsu C,Lin C,et a1. Phase Ⅱ study of cetuximab plus weekly cisplatin and 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil and leucovorin for the first line treatment of advanced gastric cancer[J]. ASCO Meeting, 2009,27: a4567.

[9] Piccarrt-Gebhart MJ,Procter M,Leyland-Jones B,et a1. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2 positive breast cancer[J]. N Engl J Med,2005,353(16): 1680.

[10] Chan A,Ganju V,Becquart D,et a1. Multicenter international phase Ⅱ study of oral inorelbine (NVBO), capecitabine(x) and trastuzum-ab (H) triple combination in HER-2 positive metastatic breast cancer (MBC): updated results with a longer follow-up[C]. SABCS,2008: 3151.

[11] Van Cutsem E,Kang Y,Chung H,et a1. Efficacy results from the ToGA trial: A phase Ⅲ study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor re-captor 2(HER2)-positive advanced gastric cancer(GC)[J]. AS-CO Meeting,2009,27: a509.

[12] Kopetz S,Glover KY,Eng C,et a1. Phase II study of infusional5 fluorouracil. 1eucovorin. and irinotecan(FOLFIRI) Plus bevacizumab as first line treatment for metastatic colorectal cancer[J]. Journal of Clinical Oncology,2007,25: 4089.

[13] Adrian J,Mharris,Adrian L,et al. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer[J]. Lancet Oncology,2010,11(12): 1172 – 1183.

[14] Costanzo D,Mazzoni F,Micol Mela M,et al. Bevacizumab in non-small cell lung cancer[J]. Drugs,2008,68(6): 737 – 746.

[15] Druker BJ,Guilhot F,O'Brien S,et a1. Long-tem bemefits of imatinib (IM) for patients newly diagnosed with chronic myelogenous leukemia in chronic phase(CML-CP): The 5-year update from the IRIS study [J]. J Clin Oncol,2006,24(338s): 6506.

[16] Hochhaus A,Druker B,Sawyers C,et a1. Favorab1e long-term follow-up resu1ts Over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-treatment[J]. Blood,2008,111(3): 1039 – 1043.

[17] Hayashibara K,Satoh H,Shinohara Y,et al. A population-based study of gefitinib in patients with non-small cell lung cancer[J]. Medical Oncology,2009,26(2): 222 – 227.

[18] Stewart JS,Cohen EE,Licitra L,et a1. Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. J Clin Oncol,2009,27(11): 1864 – 1871.

[19] Escudier B,Eisen T,Stadler WM,et al. sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2007, 356(2):125 – 134.

[20] Llovet J,Ricci S,Mazzaferro V,et a1. Sorafenib in advanced Hepa-tocellular Carcinoma[J]. N Eng J Med,2008,359(4): 378 – 390.

[21] Motzer RJ,Hutson TE,Tomczak P,et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma[J]. N Engl J Med,2007,356(2): 115 – 124.

[22] Shirao K,Nishida T,Doi T,et al. Phase I/II study of sunitinib malate in Japanese patients with gastrointestinal stromal tumor after failure of prior treatment with imatinib mesylate. Invest New Drugs,2009,28: 866 – 875.

(编辑:周小林)