

李仙晓,李瑞生,李晓娟,等. 安罗替尼上调射频消融对肺鳞癌肿瘤组织杀伤作用的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 115-120.

Li XX, Li RS, Li XJ, et al. Anlotinib enhances the anti-tumor effect of radiofrequency ablation on patient-derived lung squamous cell carcinoma tissues [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 115-120.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.05.019

安罗替尼上调射频消融对肺鳞癌肿瘤组织 杀伤作用的实验研究

李仙晓^{1,2}, 李瑞生³, 李晓娟³, 晋颖^{1*}

(1.北京新里程肿瘤医院,肿瘤内科,北京 100161; 2.中国人民解放军空军总医院,肿瘤内科,北京 100142;
3.中国人民解放军总医院第五医学中心,临床研究管理中心,北京 100039)

【摘要】 目的 利用患者来源肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LSCC)组织建立裸鼠皮下肿瘤模型,确定安罗替尼(Anlotinib)对射频消融(radiofrequency ablation, RFA)肺鳞癌皮下肿瘤组织的增敏作用。**方法** 收集患者来源的LSCC组织,通过定量PCR(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)方法检测LSCC中Anlotinib的作用靶标表达情况。随后构建裸鼠皮下肿瘤模型,Anlotinib口服灌胃给药,对裸鼠皮下肿瘤进行射频消融治疗(Radiofrequency ablation, RFA)处理,再用qPCR方法检测Anlotinib对LSCC中上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关因子表达的影响。**结果** 利用患者来源的LSCC组织获得了裸鼠皮下肿瘤组织,其中Anlotinib的作用靶标有明确表达;RFA能够有效杀伤LSCC在裸鼠皮下的肿瘤组织,Anlotinib能够通过抑制肿瘤组织中的EMT作用发挥对RFA杀伤LSCC组织的增敏作用。**结论** 安罗替尼能够在裸鼠模型中上调RFA对患者来源LSCC组织的杀伤作用,能够为LSCC诊疗提供新的启示。

【关键词】 肺鳞癌;安罗替尼;患者来源肿瘤组织;射频消融

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 05-0115-06

Anlotinib enhances the anti-tumor effect of radiofrequency ablation on patient-derived lung squamous cell carcinoma tissues

LI Xianxiao^{1,2}, LI Ruisheng³, LI Xiaojuan³, JIN Ying^{1*}

(1. Department of Oncology, Beijing Xin-Li-Cheng Cancer Hospital, Beijing 100161, China.

2. Department of Oncology, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100142.

3. Clinical Research Management Center, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039)

【Abstract】 Objective To establish a subcutaneous tumor model in nude mice using patient-derived tissues (PDTs) of lung squamous cell carcinoma (LSCC) and determine the sensitization effect of anlotinib on radiofrequency ablation (RFA)-mediated inhibition of subcutaneous LSCC growth. **Methods** Patient-derived LSCC tissue was collected and qPCR was used to detect the expression of the target of anlotinib. Then, the tissue was subcutaneously implanted into nude mice to form tumor tissues. Oral administration of anlotinib and RFA treatment of subcutaneous tumors were performed, and qPCR was used to detect epithelial-mesenchymal transition of LSCC. **Results** Subcutaneous tumor tissue

[作者简介] 李仙晓(1981—),女,硕士,主治医师,研究方向:肺肿瘤。E-mail: lxx0326@sina.com

[通信作者] 晋颖(1981—),女,硕士,主治医师,研究方向:肺肿瘤。E-mail: 187910351499@163.com

in nude mice was generated from patient-derived LSCC tissues. The target of anlotinib was clearly expressed. RFA effectively killed subcutaneous LSCC tumor tissues. Anlotinib affected RFA by inhibiting EMT in tumor tissue to sensitize LSCC tissues to killing. **Conclusions** Anlotinib increases the killing effect of RFA on patient-derived LSCC tissues in a nude mouse model, which may facilitate the diagnosis and treatment of LSCC.

【Keywords】 lung squamous cell carcinoma; anlotinib; patient-derived tissues; radiofrequency ablation

随着环境污染的不断加剧以及人口老龄化的趋势不断进展,肺癌(lung cancer)仍是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。分子靶向药物(molecular targeting agents)是肺癌的主要治疗策略之一,但目前分子靶向药物主要用于肺腺癌(lung adenocarcinoma, LAC)为代表的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗,而多来源于气管鳞状上皮的肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LSCC)尚无明确的分子靶向药物^[2]。因此,研究和发现适用于 LSCC 的分子靶向药物,不仅有助于拓展 LSCC 治疗的策略,同时也能够加深对分子靶向药物的认识。

另一方面,随着疾病进展 LSCC 肿瘤组织体积不断增大易于引起支气管狭窄或阻塞性肺炎等,常见的治疗策略是外科手术切除等开放性手术治疗策略^[3]。射频消融治疗(radiofrequency ablation, RFA)是一种介入治疗策略,能够在精确毁损/消融肿瘤组织的同时最大限度的保护肿瘤组织周围的正常组织(即癌旁组织:para-tumortissues)免受损伤^[4],这使得 RFA 成为 LSCC 治疗的理想策略;RFA 一方面能够直接消融 LSCC 组织以实现抗肿瘤作用,同时也能保护通过直接销毁 LSCC 肿瘤组织以维系呼吸道的正常组织结构并直接缓解 LSCC 组织占位引起的支气管狭窄或阻塞性肺炎。已有研究表明,RFA 联合分子靶向药物治疗有助于实现更好地有效抗肿瘤效果的同时,规避各自的不良反应。

分子靶向药物安罗替尼(Anlotinib)已被应用于 NSCLC 治疗^[5]。为拓展我们对 LSCC 的分子靶向治疗的认识并利用动物模型探索 RFA 对 LSCC 的抗肿瘤作用,本研究首先检测了 LSCC 的动物模型,在此基础上检测了 LSCC 对 Anlotinib 的敏感性,最终发现 Anlotinib 能够上调 RFA 对 LSCC 肿瘤组织的杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选 60 只雌性 SPF 级 BALB/c 裸鼠,4 周龄,体重 13~14 g。由斯贝福(北京)生物科技有限公司提

供[SCXK(京)2016-0002];饲养于解放军总医院第五医学中心动物实验室[SYXK(军)2017-0016]。实验动物的使用以及研究方案通过解放军总医院第五医学中心动物伦理委员会审查(IACUC-2017-019)。在实验过程中严格遵循 3R 原则给予实验动物福利。

1.2 主要试剂与仪器

患者来源 LSCC 组织(5 例)来自 LSCC 外科手术的切除标本;DMEM 培养基、胎牛血清为美国 Thermo 公司产品;分子靶向药物纯品安罗替尼(Anlotinib,产品编号为 S8726)购买自美国 Selleck 公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒以及 qPCR 试剂盒购买自美国 ABI 公司;吸入麻醉剂(异氟烷, isoflurane)购自深圳瑞沃德公司;甲状腺消融针(货号 UniBlate 700-103587 17G)购自 RITA 公司;有机溶剂二甲亚砜(DMSO)、吐温 80、聚乙二醇(PEG400)均为国药集团北京公司产品;手术器械和材料均由本实验室保存。qPCR 仪(美国 ABI 公司,ABI-7500 型号)。

1.3 实验方法

1.3.1 Anlotinib 药物工作液的配制

首先称取 Anlotinib 的药物纯品粉末,再使用有机溶剂二甲亚砜(DMSO)、吐温 80 以及聚乙二醇(PEG400)等对药物进行充分溶解。进一步使用生理盐水进行稀释,最终获得动物实验使用的 Anlotinib 溶液(其中 DMSO 终浓度不超过 1%、吐温 80 终浓度以及 PEG400 终浓度不超过 2%)^[6]。

1.3.2 qPCR

手术切除获得的 30 对成对标本(外科手术切除、气管镜切除的 LSCC\癌旁非肿瘤标本)LSCC 肿瘤组织、癌旁组织依据 ABI 公司提供的说明书提取组织中的 RNA 样本(total RNA samples)进行反转录和 qPCR 实验,确定组织标本中 Anlotinib 的作用靶标及相关信号通路目的基因的表达水平进行检测。其中 qPCR 实验目的基因表达水平的定量方法为 SYBR Green 染色法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)^[7-8],具体以作为内参(loading control)的 β 肌动蛋白(β -Actin)为标准,确定各目标基因的相对表达水平^[9-10]。结果显示为

相对表达水平(目标基因相对于 β -Actin 的倍数 [folds])绘制的散点图。qPCR 引物(5'→3')与文献^[11]相同。对于 E-Cadherin 的相对表达水平(相对倍数/relative folds)的计算方法为对照组 E-Cadherin 表达水平为单位 1, Anlotinib 治疗组 E-Cadherin 表达水平/对照组 E-Cadherin 表达水平即为 E-Cadherin 的相对表达水平。

1.3.3 裸鼠成瘤实验

将添加有 20% FBS 的 DMEM 在超净台中装入灭菌的 50 mL 离心管中(每管中约 20 mL),再收集手术切除的 LSCC 肿瘤组织。进一步在超净台中以灭菌的手术器械修整肿瘤组织获得组织微块(以精密天平进行称量,使得各个组织微块的重量在 2 mg 左右)。裸鼠麻醉后,在裸鼠皮下接种上述获得的组织微块,具体方法为:以异氟烷对裸鼠进行吸入麻醉,再使用眼科镊钝性分离小鼠腹股沟附近皮肤以暴露出腹股沟附近裸鼠下肢内侧的股静脉,使用眼科镊将前一步骤叙述的 LSCC 肿瘤组织微块接种至股静脉附近使 LSCC 组织贴附在股静脉表面以形成皮下肿瘤组织。由于肿瘤组织活性良好且接种方式利于肿瘤细胞生长(LSCC 组织贴附在股静脉表面为 LSCC 的生长提供了良好的条件),在裸鼠体内都能够形成了皮下肿瘤组织。本研究中共建立了 5 个利用患者来源的 LSCC (Patient-derived cell, PDC)建立的裸鼠皮下肿瘤模型,命名为 PDC1(PDC No. 1)、PDC2(PDC No. 2)、PDC3(PDC No. 3)、PDC4(PDC No. 4)以及 PDC5(PDC No. 5),在此基础上对于 Anlotinib 治疗以及 RFA 治疗方法:

(1)对于 Anlotinib 单独作用实验:在裸鼠接种 LSCC 组织微块后待小鼠接种 LSCC 组织时的伤口愈合良好后,对裸鼠进行口服灌胃给药,给予动物 Anlotinib(隔日灌胃一次),此时 Anlotinib 的剂量分别为:3、2、1、0.5、0.2 mg/kg。待治疗 10 次左右(约 3 周)后,收集肿瘤组织,依据肿瘤重量、肿瘤体积计算 Anlotinib 作用于 LSCC 的抑制率,同时收集肿瘤组织以 qPCR 检测 Anlotinib 对肿瘤组织中 EMT 相关因子表达的影响;选取 Anlotinib 自身无明显细胞毒性而对 LSCC 细胞 EMT 有明确抑制活性的作用剂量进行下一步实验;

(2)对于 RFA 联合 Anlotinib 共同作用实验共分四组,每组 6 只动物:在将 LSCC 肿瘤组织接种裸鼠皮下后,经过 2~3 周左右的生长(这一期间对动物进行定期观察[每 3 日使用游标卡尺测量肿瘤组

织体积一次,依据长轴×短轴×短轴/2 计算肿瘤体积])后,LSCC 组织微块能够在裸鼠皮下部位形成肿瘤组织(此时体积约为 1500~2000 mm³),此时选取 24 只动物随机分为 4 组,①对于未治疗组,LSCC 在裸鼠体内进行正常生长,不对动物进行任何干预;② Anlotinib 单纯治疗组:对裸鼠进行口服灌胃给药,给予动物 Anlotinib(隔日灌胃一次),此时 Anlotinib 的剂量分别为 0.5 mg/kg(Anlotinib 自身无明显细胞毒性而对 LSCC 细胞 EMT 有明确抑制活性的作用剂量);③对于 RFA 单独治疗:依据 Xie 等^[4]描述的方法,使用甲状腺消融针对皮下肿瘤组织进行 RFA 处理(具体 RFA 条件为 55~60℃,消融 2 min);④对于 RFA 联合 Anlotinib 治疗:对皮下肿瘤组织进行 RFA 治疗后[(2)部分步骤③方法],再通过口服灌胃给予 Anlotinib 治疗[(2)部分步骤②方法];依据系列时间点的肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线,确定 RFA、Anlotinib、RFA + Anlotinib 对 LSCC 在裸鼠皮下生长的抑制作用,依据肿瘤生长曲线的曲线下面积(area under the proliferation-curves)确定不同组的整体抑制活性。裸鼠皮下成瘤实验中,肿瘤组织的体积(Volumes)计算公式为:肿瘤长轴长度×肿瘤短轴长度×肿瘤短轴长度/2^[9]。药物作用的抑制率为:(对照组肿瘤生长曲线的曲线下面积-治疗组肿瘤生长曲线的曲线下面积)/对照组肿瘤生长曲线的曲线下面积×100%。

1.4 统计学方法

实验数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;应用 SPSS 19.0 统计学软件对各项指标数据进行正态性检验,应用进行 *t* 检验或单因素方差分析对实验结果进行分析比较。以 $P < 0.05$ 表示为差异有统计学显著性。

2 结果

2.1 Anlotinib 对 LSCC 的抗肿瘤活性检测

qPCR 结果显示了在 LSCC 患者来源肿瘤组织中(PDTs) Anlotinib 作用靶标(包括系列受 VEGFR、PDGFR 等酪氨酸蛋白激酶;MAPK、PI3K/AKT 通路主要信号分子)的表达水平(见图 1),上述因子在 30 例 LSCC PDTs 中均有表达,且表达量在 LSCC 组织中均显著高于在癌旁组织(成对标本中的癌旁非肿瘤组织标本)。这表明 Anlotinib 可能对 LSCC 具有杀伤作用。进一步结果显示(见图 2),Anlotinib 能有剂量依赖抑制 LSCC 在裸鼠皮下的成瘤作用。

进一步检测了 Anlotinib 对 LSCC 在裸鼠皮下形成的肿瘤组织中, EMT 相关因子表达的影响。结果如图 2、表 1 和表 2 所示, 0.5 mg/kg 剂量的 Anlotinib 其自身对 LSCC 的细胞毒性较弱, 但是能够在 LSCC 肿瘤组织中上调细胞上皮特征标志物 E-Cadherin 的表达、下调间质特征标志物 N-Cadherin、Vimentin 的表达水平。因此, 选取 0.5 mg/kg 剂量的 Anlotinib 进行进一步实验。

2.2 Anlotinib 能够上调 RFA 对 LSCC 肿瘤组织的杀伤作用

结果如图 3 所示, 将 LSCC 肿瘤组织微块接种裸鼠皮下形成肿瘤组织; 在此基础上 RFA 处理 LSCC 肿瘤组织后, LSCC 皮下肿瘤的生长速度明显减缓, 0.5 mg/kg 剂量的 Anlotinib 其自身对 LSCC 的细胞毒性较弱, 但能够显著增强 RFA 对 LSCC 在裸

鼠皮下生长的抑制作用, 此时肿瘤组织的生长不仅出现了生长抑制, RFA 联合安罗替尼治疗组肿瘤组织逐渐萎缩。结果显示为各组 LSCC 形成皮下肿瘤组织的照片(图 3A), 各组肿瘤组织的生长曲线(图 3B), 上皮间质转化(EMT)相关因子在肿瘤组织中的表达检测(E-Cadherin C、N-Cadherin D 以及 Vimentin E), 以及依据生长曲线的曲线下面积计算所得的抑制率(表 3)。这表明, Anlotinib 联合 RFA 治疗能够增加 LSCC 对 RFA 的敏感性。

3 讨论

目前, 肺癌相关分子靶向药物以及研究工作的热点仍然主要是作用于 EGFR 等以易瑞沙(Gefitinib, 吉非替尼)为代表的小分子蛋白激酶抑制剂, 而对 LSCC 的相关研究不足^[2]。尽管现有分子靶向药物的广泛应用能够显著延长患者生存期、改善患者的生存质量但是随着治疗的进行, 患者易于出现药物耐受^[10]。为克服这些问题, 以 Anlotinib 为代表的新型分子靶向药物被应用于 NSCLC 治疗^[3]。与 Gefitinib 不同, Anlotinib 是作用于 VEGFR、PDGFR 等的多靶标蛋白激酶抑制剂^[3]。全球多中心临床试验的结果认为 Anlotinib 能够有效发挥对 NSCLC 的抗肿瘤作用并为患者带来新的希望, 但是目前 LSCC 的分子靶向治疗严重滞后, 也未能因此足够重视。为解决这一问题, 本研究首先

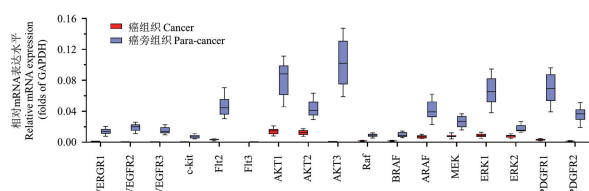


图 1 分子靶向药物作用靶标在肺鳞癌/癌旁组织标本中的表达检测

Figure 1 Endogenous expression of RTKs and protein kinases in lung squamous cell carcinoma or the non-tumor tissues

表 1 安罗替尼对肺鳞癌组织皮下成瘤的抑制活性

Table 1 Inhibitory effect of Anlotinib on subcutaneous tumorigenesis of lung squamous cell carcinoma

安罗替尼剂量 (mg/kg) Dose of Anlotinib	肿瘤体积 Tumor volumes	肿瘤重量 Tumor weights	神经型钙黏附蛋白 N-Cadherin	波形蛋白 Vimentin
	抑制率 (%) Inhibitory rates			
3.0	68.53±3.84	69.04±3.02	87.65±5.32	80.22±6.01
2.0	64.01±7.36	64.46±7.23	80.36±4.67	69.85±4.33
1.0	51.5±7.12	51.79±7.28	71.10±3.33	62.71±5.55
0.5	20.57±11.16	19.31±13.22	62.31±6.02	53.77±3.00
0.2	-1.93±18.18	1.66±15.83	47.21±2.88	40.67±3.48

表 2 安罗替尼上调肺鳞癌组织中 E-Cadherin 表达水平

Table 2 Treatment of Anlotinib enhanced the expression level of E-Cadherin in subcutaneous tumor tissues formed by lung squamous cell carcinoma cells

安罗替尼剂量 (mg/kg) Dose of Anlotinib	E-Cadherin 表达水平 (相对倍数) E-Cadherin expression (relative folds)
3.0	4.50±0.67
2.0	3.87±0.25
1.0	3.21±0.10
0.5	2.58±0.44
0.2	1.83±0.57

表 3 RFA、Anlotinib、RFA 联合 Anlotinib 对 LSCC 肿瘤组织的抑制率

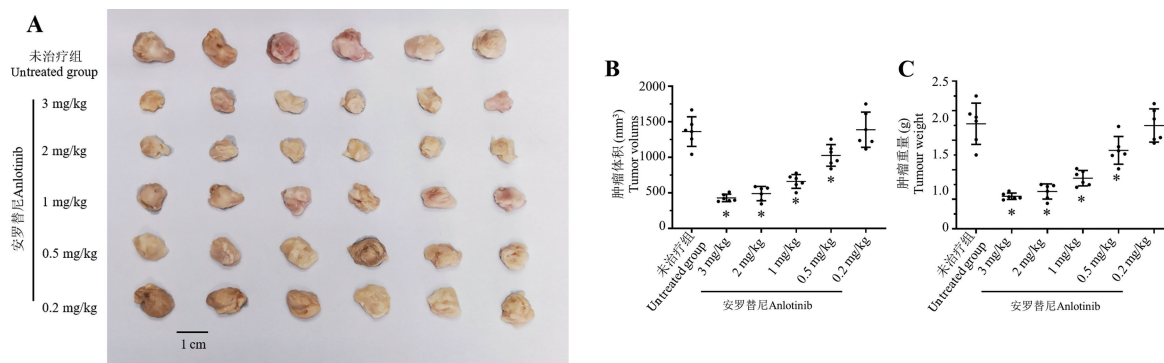
Table 3 Inhibition rates of RFA, Anlotinib, RFA + Anlotinib on LSCC cells' subcutaneous growth

细胞系 Cell lines	射频消融 RFA	安罗替尼 (0.5 mg/kg) Anlotinib	射频消融+ 安罗替尼 (RFA+ Anlotinib)
	抑制率 (%) Inhibitory rates		
NCI-H520	11.64	4.42	53.4
PDC No 1	9.27	6.29	67.4
PDC No 2	5.91	7.66	42.97
PDC No 3	15.51	16.6	87.29
PDC No 4	8.53	6.71	60.1
PDC No 5	8.16	10.43	58.47

发现 LSCC 组织中 VEGFR、PDGFR 等 Anlotinib 的作用靶标有明确表达这一重要研究线索,在此基础上建立了 LSCC 相关肿瘤模型并探索研究了 Anlotinib 对 LSCC 的抗肿瘤活性。结果表明,Anlotinib 对 LSCC 在裸鼠皮下生长也有明确的抗肿瘤活性,Anlotinib 有望作为 LSCC 的分子靶向药物,这不仅有重要的研究意义同时也有望为患者带来新的

福音。

进一步,LSCC 的治疗主要是手术切除治疗,但是胸腔的开放式手术会给患者带来很大损伤^[12]。以射频消融(RFA)为代表的新兴的介入治疗策略能够实现对脏器肿瘤病灶的微创与精准治疗,目前主要应用在进展期 HCC 相关治疗^[4],而在 LSCC 中的应用尚无报道。气管镜等相关诊疗技术的进展

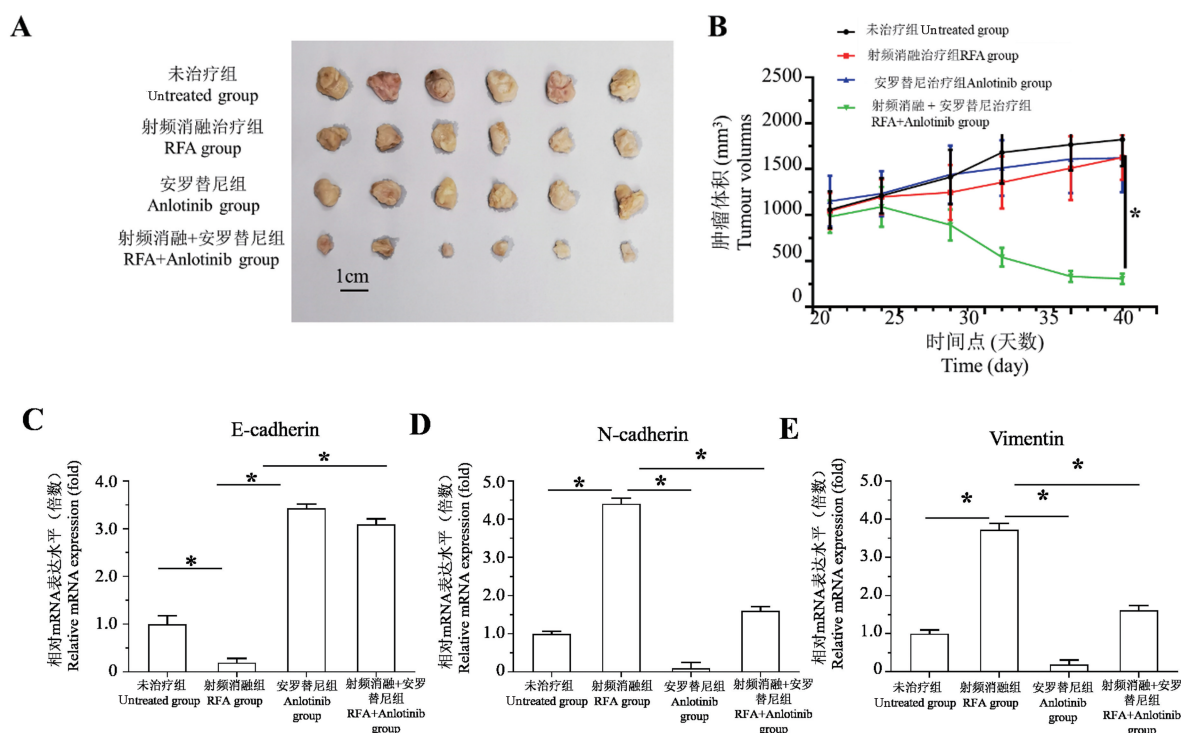


注:A:肿瘤组织照片;B:肿瘤体积;C:肿瘤重量。

图2 安罗替尼对肺鳞癌组织皮下成瘤的抑制活性

Note. A, Pictures of tumor tissues. B, Tumor volumes. C, Tumor weights.

Figure 2 The inhibitory effect of Anlotinib on subcutaneous tumorigenesis of lung squamous cell carcinoma



注:A:肿瘤组织照片;B:肿瘤生长曲线;C:E-Cadherin 的表达水平;D:N-Cadherin 的表达水平;E:Vimentin 的表达水平。

图3 安罗替尼能够上调射频消融 RFA 对肺鳞癌裸鼠皮下肿瘤组织

Note. A, Pictures of tumor tissues. B, Tumor growth curve. C, Expression level of E-cadherin. D, Expression level of N-Cadherin. E, Expression level of Vimentin.

Figure 3 Anlotinib can upregulate RFA of lung squamous cell carcinoma in nude mice

使得肺部介入治疗策略能够得以应用并实现介入的全肺抵达^[13],因此气管镜与 RFA 联合策略在 LSCC 治疗有良好的应用前景;在有效和直接消融堵塞呼吸道、气管、支气管的 LSCC 组织并尽可能减少对呼吸道组织的损伤作用。但另一方面,RFA 治疗也存在诸多挑战:(1) RFA 治疗的能量和治疗温度不能无限增高,可能会存在不完全消融的情况;(2) RFA 一方面能够发挥对 LSCC 组织的杀伤作用,同时也有可能诱导 LSCC 组织的 EMT 作用,引起 LSCC 的复发或转移作用。本研究选取了较为温和的 RFA 条件(50℃~60℃,2 min),并辅以 Anlotinib 治疗。结果显示,Anlotinib 能够发挥对 RFA 的增敏作用,显著加强 RFA 对 LSCC 在裸鼠皮下的增殖作用。同时,Anlotinib 能够抑制 RFA 诱导的 LSCC 组织的 EMT 作用。因此,本研究不仅揭示了 Anlotinib 能够应用于 LSCC 治疗,同时也建立了 LSCCRFA 的研究模型,为今后的进一步研究奠定了坚实基础。

同时,本研究在技术上也具有重要意义:(1) 目前肺癌常用的研究模型:以 A549(肺腺癌)、H460(大细胞肺癌)为代表的细胞系的组织来源以 NSCLC 为主,而 LSCC 细胞系很少,同时长期使用、体外培养的现有细胞系与患者体内的差异也在近年引起重视^[14],因此本研究建立的 LSCCPDCs 具有重要意义,为 LSCC 相关研究奠定了坚实基础;(2) 裸鼠皮下肿瘤模型易于观察与操作,易于进行经皮穿刺的 RFA 处理 LSCC 肿瘤组织;同时 RFA、Anlotinib 治疗的效果也能够依据肿瘤体积变化、肿瘤重量定量分析;(3) 与气管、支气管等原发部位的肿瘤体积相当、可比性强,同时本研究的结果显示,RFA 联合 Anlotinib 处理 LSCC 肿瘤组织后肿瘤组织逐渐生长停滞和萎缩,这也为进一步奠定了坚实基础。

致谢:感谢中国人民解放军总医院第五医学中心介入科谢辉博士、副主任医师在裸鼠 RFA 实验中给予的指导和帮助!

参考文献:

- [1] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.
- [2] Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 144: 19-50.
- [3] Conti L, Gatt S. Squamous-cell carcinoma of the lung [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(11): e17.
- [4] Xie H, Tian S, Yu H, et al. A new apatinib microcrystal formulation enhances the effect of radiofrequency ablation treatment on hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 3257-3265.
- [5] Han B, Li K, Wang Q, et al. Effect of Anlotinib as a third-Line or further treatment on overall survival of patients with advanced non-small cell lung cancer: The alter 0303 phase 3 randomized clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(11): 1569-1575.
- [6] Wang Y, Tang Z. A novel long-sustaining system of apatinib for long-term inhibition of the proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 8529-8541.
- [7] Ji Q, Xu X, Li L, et al. miR-216a inhibits osteosarcoma cell proliferation, invasion and metastasis by targeting CDK14 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3103.
- [8] Liang Y, Xu X, Wang T, et al. The EGFR/miR-338-3p/EYA2 axis controls breast tumor growth and lung metastasis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7): e2928.
- [9] Jia H, Yang Q, Wang T, et al. Rhamnetin induces sensitization of hepatocellular carcinoma cells to a small molecular kinase inhibitor or chemotherapeutic agents [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(7): 1417-1430.
- [10] Cho JH, You YM, Yeom YI, et al. RNF25 promotes gefitinib resistance in EGFR-mutant NSCLC cells by inducing NF-κB-mediated ERK reactivation [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 587.
- [11] 魏永, 李晓娟, 姜棋予, 等. 透明细胞肾癌裸鼠模型构建及靶向药物敏感性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 98-105.
- [12] Socinski MA, Obasaju C, Gandara D, et al. Current and emergent therapy options for advanced squamous cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(2): 165-183.
- [13] Rehman S, Lovvorn HN, Rickman OB, et al. Unique application of awake tracheoscopy and endobronchial ultrasound in the management of tracheal mucoepidermoid carcinoma [J]. *Head Neck*, 2018, 40(6): E58-E61.
- [14] Hou J, Hong Z, Feng F, et al. A novel chemotherapeutic sensitivity-testing system based on collagen gel droplet embedded 3D-culture methods for hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 729.

[收稿日期]2020-07-26