靶向结合骨肉瘤血管内皮细胞短肽的体外功能验证

杨澜波　邹春雨　米豫飞　王战朝　史占军　黄　涛

摘　要　目的　验证体外培养的鼠源性骨肉瘤血管内皮细胞(osteosarcoma – associated vascular endothelial cells, OAVECs)与 7 肽 TKPDKGY(TY – 7)的结合特异性。**方法**　原代培养获得 OAVECs 和裸鼠主动脉血管内皮细胞(aortic endothelial cells, AECs)并进行内皮细胞免疫组化鉴定。合成 TY – 7 并在其 N 端标记一个荧光素(FITC),通过荧光显微镜和流式细胞仪来评价 TY – 7 与 OAVECs、AECs 及骨肉瘤细胞 UMR – 106 的亲和度。**结果**　荧光显微镜可见 OAVECs 与 TY – 7 结合后在镜下清晰显像,而 UMR – 106 细胞和 AECs 并不显像。流式细胞仪则定量显示 TY – 7 与靶细胞 OAVECs 的结合率(89.54%)远高于 UMR – 106(0.27%)和 AECs(0.22%)。**结论**　TY – 7 可高度特异结合 OAVECs,而不与 AECs 及骨肉瘤细胞 UMR – 106 结合。

关键词　骨肉瘤　肿瘤血管内皮细胞　特异性结合肽　体外验证

中图分类号　R738.1　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.025

In – vitro Functional Identification of Short Peptide Binding Specifically to Osteosarcoma – associated Vascular Endothelial Cells.

Yang Lanbo, Zou Chunyu, Mi Yufei, et al. Luoyang Orthopedic – Traumatological Hospital of Henan Province, Henan 471002, China

Abstract　**Objective**　To identify the in – vitro binding specification of the short peptide(TKPDKGY, TY – 7) to osteosarcoma – associated vascular endothelial cells. **Methods**　OAVECs and AECs were derived from primary culture and characterized by immunocytochemical technology. TY – 7 was synthesized and marked with fluorescein isothiocyanate(FITC). Fluorescence microscopy and flow cytometry were used to detect the in – vitro binding activity. **Results**　Fluorescence microscopy observed that TY – 7 was only selectively binding to OAVECs, whereas negligible binding to AECs and UMR – 106. Flow cytometry showed that the fluorescence positive cell rate was 89.54% in the OAVECs, 0.27% in the UMR – 106 and 0.22% in the AECs respectively. **Conclusion**　TY – 7 has the specifically binding activity to OAVECs.

Key words　Osteosarcoma; Tumor – associated vascular endothelial cells; Specifically binding peptide; Functional identification in vitro

骨肉瘤起源于成骨细胞,是最常见的运动系统恶性肿瘤,多见于膝关节周围,占青少年骨肿瘤的 56%,其特点是全身转移快及局部侵袭强[1~3]。虽然越来越多的新方法被用于骨肉瘤的诊断和治疗,但自 20 世纪 90 年代以来,骨肉瘤的总体生存率并没有提高[4]。通过大剂量化疗来克服肿瘤耐药的同时常伴随着严重的不良事件,如严重的骨髓抑制和其他器官毒性,甚至可能危及生命[5]。如何实现有效治疗肿瘤的同时尽可能降低化疗药物的不良反应,是当前研究的一个热点。随着肿瘤分子生物学的发展,人们逐渐开始关注骨肉瘤的靶向化疗[6]。

血管可以为肿瘤细胞输送营养物质和氧气,若无足够的新生血管,肿瘤就无法生长[7]。因此,肿瘤内的血管系统可作为治疗肿瘤的一个有效靶点[8]。肿瘤血管靶向药物为肿瘤治疗提供了一个非细胞毒性的新途径。噬菌体展示技术是一种高效获取全新生物活性肽的实用技术[9]。将噬菌体展示技术应用于寻找特异结合肿瘤血管内皮细胞的短肽,为开发新的肿瘤血管靶向肽类药物提供了新的方向。在之前的研究中,笔者已经利用噬菌体展示技术,筛选出了能与 OAVECs 靶向结合 7 肽 TY – 7,并证实表达此 7 肽的噬菌体能特异性结合 OAVECs。本研究通过合成该肽,在体外细胞水平验证了其与 OAVECs 结合的特异性,现报道如下。

材料与方法

1. 实验动物与材料:3 周龄 SPF 级 BALB/c – nu 裸鼠,体质量 13.8 ± 0.7g,购自南方医科大学动物实验中心,SPF 级动物房饲养,模拟正常昼夜节律光照,自由饮食。骨肉瘤 UMR – 106 细胞株购自中国人民解放军空军军医大学,DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白

基金项目:河南省医学科技攻关计划(201404055)

作者单位:471002　河南省洛阳正骨医院、河南省骨科医院(杨澜波、邹春雨、米豫飞、王战朝);510515　广州,南方医科大学南方医院关节骨病外科(史占军);471031　洛阳,中国人民解放军联勤保障部队第 989 医院(黄涛)

通讯作者:黄涛,电子信箱:Huangtao1963@163.com

酶/0.02% 乙二胺四乙酸（0.25% Trypsin/0.02% EDTA）、Ⅱ型胶原酶、磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）及新生小牛血清（newborn calf serum，NBCS）购自美国 Gibco 公司，Ⅰ型鼠尾胶原购自广州威佳公司，血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factors，VEGF）购自上海基因公司，抗细胞Ⅷ因子相关抗原兔多抗工作液、羊抗兔 IgG、抗生物素－过氧化物酶（ABC）及 DAB 试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司，青霉素及链霉素购自华北制药有限公司。侧链保护的 20 种 L 型 9－芴基甲氧羰基（Fmoc）氨基酸、1－羟基苯并三唑（HOBt）、固相载体 9－芴基甲氧羰基亮氨酰－2－氯三苯基（Fmoc－Leu－2－Cl－Trt resin）树脂、N，N′－异丙基碳二亚胺（DIC）购自广州百奥肽公司，异硫氰酸荧光素（FITC）购自美国 Sigma 公司。

2. OAVECs 特异性结合肽的合成及纯化：采用 Fmoc 固相合成 TY－7，使用制备型高效液相仪分离纯化后于 N 端标记一个 FITC 基团。FITC－TKPDK-GY（FITC－TY－7）成品使用检测型 HPLC 仪和质谱仪进行分析鉴定。

3. UMR－106 细胞的培养和骨肉瘤动物模型的构建：UMR－106 细胞使用含 10% NBCS 的 RPMI1640 培养基，在饱和湿度、95% O_2 和 5% CO_2 及恒温 37℃的条件下常规培养。取对数生长期的 UMR－106 细胞，用胰酶消化后，PBS 漂洗两遍，使用无血清 RPMI1640 培养基制成浓度为 10^8/ml 的动物模型接种细胞悬液。选取健康活跃裸鼠，消毒后于裸鼠左侧腋下皮下注射 UMR－106 细胞悬液 0.1ml。造模 1 周后即可成瘤，3 周后肿瘤直径可达 1cm。

4. 原代培养：正常血管内皮细胞：颈椎脱臼处死裸鼠，无菌条件下迅速打开胸腹腔取出主动脉，PBS 液冲净血液，剥除血管周围结缔组织，加入胶原酶 37℃消化 30min。收集消化后的液体离心（1000r/5min）弃上清，加入培养基（低糖型 DMEM、20% FBS、15U/ml 肝素、2ng/ml VEGF、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml）重悬沉淀后种植于Ⅰ型鼠尾胶原包被的培养皿中。2h 后待内皮细胞贴壁后换液去除污染的成纤维细胞。待细胞生长分裂融合成单层、铺满皿底后传代。骨肉瘤血管内皮细胞：在无菌条件下，将荷瘤裸鼠颈椎脱臼处死切取肿瘤，显微镜下分离肿瘤内血管，后续处理与原代培养正常血管内皮细胞相同。

5. 血管内皮细胞的免疫组化鉴定：取生长良好的 OAVECs、AECs 细胞爬片，漂洗后使用 4% 多聚甲醛固定 15min。再次漂洗后加入 3% H_2O_2 封闭 10min。非免疫血清室温孵育 10min，洗片后加入 50μl 一抗（兔源抗Ⅷ因子相关抗原多抗工作液）4℃过夜。再次洗片后加入 50μl 二抗（生物素标记羊抗兔 IgG 工作液）温育 30min。最后洗片 2 次后加入 ABC 溶液 37℃孵育 15min，DAB 试剂盒显色。空白对照组使用 PBS 液代替一抗。封片置于镜下观察 3 个代表性视野，计数 100 个细胞得出阳性率。

6. FITC－TY－7 与 OAVECs 特异性结合的检测：（1）荧光显微镜：取生长良好的 UMR－106、AECs 及 OAVECs 细胞爬片，漂洗固定后避光加入 5μmol/L 的 FITC－TY－7，37℃孵育 30min。充分漂洗、中性甘油封片后荧光显微镜观察。另取 OAVECs 与单纯 FITC 基团作用作为对照组。（2）流式细胞仪：取生长良好的 UMR－106、AECs 及 OAVECs 细胞悬液分别加入流式细胞仪上样管，离心弃上清后加入 1～2 滴 PBS 液稀释。每种细胞均分别避光加入 FITC－TY－7、单纯 FITC 基团和 PBS 液室温孵育 30min。最后，PBS 液稀释至上样管的 2/3，轻振试管后再次离心弃上清，固定后检测。

结　　果

1. FITC－TY－7 的合成纯化：FITC－TY－7 的纯度为 98.71%，进行质谱鉴定并测定相对分子质量为 1197.3（图 1）。

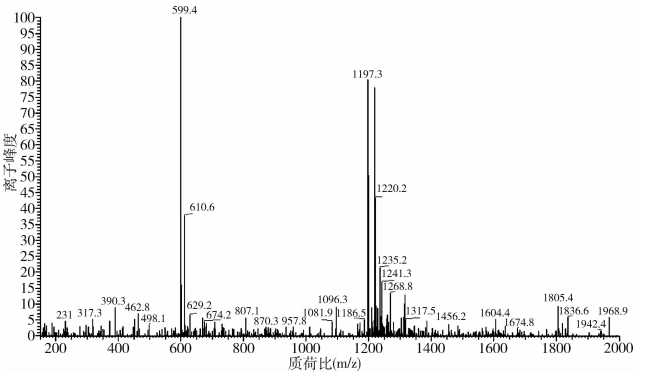


图 1　FITC－TY－7 质谱鉴定结果图

2. 原代培养：肿瘤血管内皮细胞于种植后第 4 天即可见到明显的内皮细胞集落，正常血管内皮细胞则第 6 天可见细胞集落。OAVECs 和 AECs 形态上无明显差别，呈多角形、短梭形或不规则形，核清晰，呈椭圆形或圆形。两种细胞均生长迅速，约 7～9 天后细胞汇合即生长减缓。传至 3～4 代时，细胞开始逐渐不再贴壁，数目减少，停止生长，变性变形直至死亡。

3. 免疫组化鉴定：Ⅷ因子免疫组化显示 AECs 和 OAVECs 胞质均呈黄褐色着色，AECs 阳性细胞率为

97.3%，OAVECs 阳性细胞率为 98.7%，而阴性对照组无特殊显色(图 2)。

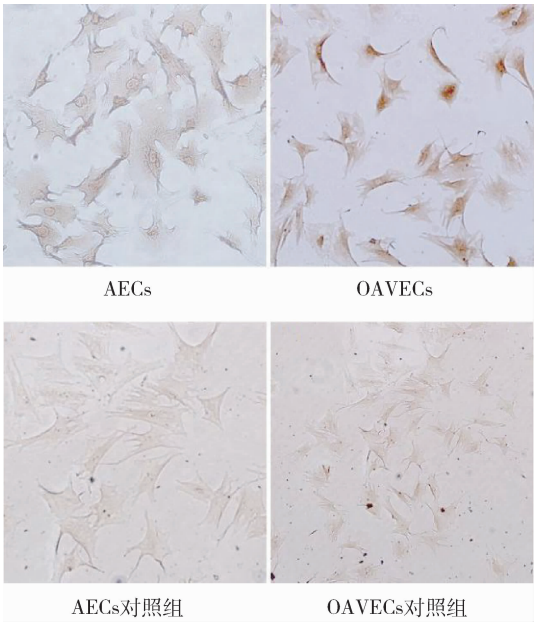


图 2　AECs 和 OAVECs 的Ⅷ因子免疫组化鉴定(×200)

4. FITC－TY－7 与 OAVECs 特异性结合的检测：(1)荧光显微镜：OAVECs 与 FITC－TY－7 作用后细胞表面荧光较强且清晰，显示明确结合；而 AECs 及 UMR－106 与 FITC－TY－7 作用后荧光微弱模糊且与背景荧光一致，可认为此两种细胞与 FITC－TY－7 无特异性结合(图 3)。(2)流式细胞仪：OAVECs 与 FITC－TY－7 作用时，荧光标记的阳性细胞比例达 89.54%；而 AECs 和 UMR－106 与 FITC－TY－7 作用时，荧光标记细胞比例分别为 0.27% 和 0.22%(图 4)。单纯 FITC 基团分别与 3 种细胞作用时，荧光标记细胞比例均 <1.00%。

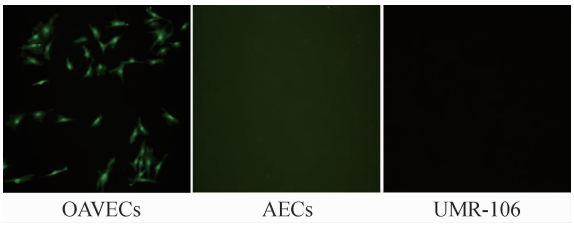


图 3　FITC－TY－7 作用后荧光显微镜成像(×100)

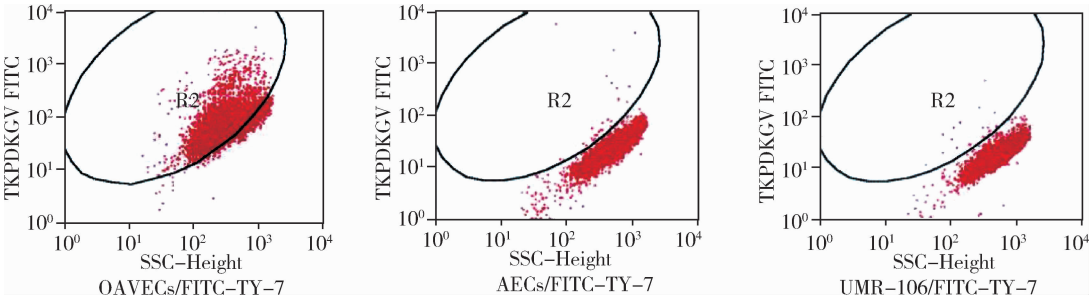


图 4　流式细胞仪检测细胞与 FITC－TY－7 的结合

讨　论

血管在恶性肿瘤进展中起着至关重要的作用，肿瘤生长、转移、复发时必须打开“血管生成开关”，才能诱导肿瘤生长至 1～2mm[10]。几乎所有的恶性肿瘤都具有持续的血管生成能力，这是侵袭性的重要基础[7]。近年来，传统细胞毒性抗肿瘤药物的获得性耐药引发了对更具针对性的新治疗策略的探索，肿瘤微环境被认为是重要的潜在治疗靶点，其中最关键的是抗血管治疗[11]。从传统的以肿瘤细胞为中心的治疗策略转向抗血管治疗模式，开辟了肿瘤治疗的新领域[12]。肿瘤抗血管治疗并不是直接通过细胞毒性针对肿瘤细胞，而是通过破坏血管实现阻断氧气、生长因子和营养的供应[13]。越来越多的研究表明，抗血管药物以肿瘤血管内皮细胞为攻击目标，直接针对已建立但异常的肿瘤血管系统，以肿瘤优先的方式迅速阻断血流，导致肿瘤内快速广泛的缺氧和肿瘤细胞死亡[14]。肿瘤血管内皮细胞基因稳定性较好，同质性强，标志物稳定，可以有效避免耐药。另外，静脉应用抗血管药物可直接作用于肿瘤血管内皮细胞，从而提高药效，降低耐药性，减少不良反应[15]。与传统治疗方法比较，直接靶向肿瘤血管可以应用于多种肿瘤，在数小时内达到治疗效果[16]。

多项研究证实通过血栓形成选择性阻断肿瘤血管可有效地杀死肿瘤，延长晚期患者的生存期[13,17]。在过去的几十年里，已经开发出数种专门阻断肿瘤血管的治疗方法，可在数小时或数天内破坏肿瘤血管系统，降低血管密度，抑制肿瘤血流，导致广泛的肿瘤坏死[18～20]。血管靶向化疗有望为恶性肿瘤治疗带来革

命性的变化,但是如何寻找特异性结合肿瘤血管内皮细胞的基团至关重要。Bussolati 等[21]通过噬菌体展示技术获得了亲和肾肿瘤血管内皮细胞的噬菌体克隆 CVGNDNSSC,根据序列合成短肽并证实该肽可特异性结合肾肿瘤血管内皮细胞而不与正常血管及其他肿瘤的血管内皮细胞结合。Arap 等[22]同样利用噬菌体展示技术得到了能与前列腺肿瘤血管靶向结合的短肽 SMSIARL。而 Sharma 等[23]则更进一步,把肿瘤血管导敏肽(CGKRK)与促凋亡肽(KLAKLAK)结合制成纳米颗粒,在胶质母细胞瘤和乳腺癌的治疗中显示出良好的效果。

骨肉瘤生长侵袭严重依赖血管的形成,针对肿瘤血管系统的治疗具有广阔的前景,有望成为克服传统大剂量化疗弊端的新策略。为得到可特异性结合 OAVECs 的低分子基团,管明强等[24]利用噬菌体展示技术获取了能靶向结合 UMR-106 荷瘤裸鼠肿瘤血管的噬菌体(TKPDKGY),并通过该单克隆噬菌体初步验证了其结合的特异性。本研究中,笔者进一步根据此噬菌体的序列合成了短肽 TY-7 并标记 FITC,在体外细胞水平通过荧光显微镜及流式细胞仪对其与 OAVECs 的结合特异性进行了验证。荧光显微镜显示 TY-7 可靶向结合 OAVECs,但与正常血管内皮细胞和骨肉瘤细胞无明显结合。流式细胞仪则进一步证实 TY-7 与 OAVECs 结合率(89.54%)远高于与 UMR-106(0.27%)和 AECs(0.22%),说明 TY-7 能高度与 OAVECs 特异性结合。以上实验通过定性和定量两方面验证了 TY-7 具备与 OAVECs 靶向结合的能力,同时并不与骨肉瘤细胞及裸鼠正常血管内皮细胞结合。

在靶向诊疗的研究中,能否得到可高选择性结合靶点的基团至关重要。本研究中由噬菌体展示技术获得的短肽 TY-7 具有在体外细胞水平高度特异结合 OAVECs 的能力。在此基础上,笔者将进一步实现 TY-7 与效应分子结合,研究其对骨肉瘤的靶向治疗作用,或与造影剂结合,评价其诊断示踪作用,为骨肉瘤血管靶向诊疗提供实验基础。

参考文献

1 Liang X, Zhang L, Ji Q, *et al*. miR-421 promotes apoptosis and suppresses metastasis of osteosarcoma cells via targeting LTBP2[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3):10978-10987

2 He JP, Hao Y, Wang XL, *et al*. Review of the molecular pathogenesis of osteosarcoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(15): 5967-5976

3 He A, Yang X, Huang Y, *et al*. CD133$^+$ CD44$^+$ cells mediate in the lung metastasis of osteosarcoma[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(8):1719-1729

4 Berner K, Johannesen TB, Berner A, *et al*. Time-trends on incidence and survival in a nationwide and unselected cohort of patients with skeletal osteosarcoma[J]. Acta Oncol, 2015, 54(1):25-33

5 Fu XH, Li J, Zou Y, *et al*. Endostar enhances the antineoplastic effects of combretastatin A4 phosphate in an osteosarcoma xenograft [J]. Cancer Lett, 2011, 312(1):109-116

6 Rainusso N, Wang L, Yustein JT. The adolescent and young adult with cancer: state of the art-bone tumors[J]. Curr Oncol Rep, 2013, 15(4):296-307

7 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5):646-674

8 Mashreghi M, Azarpara H, Bazaz MR, *et al*. Angiogenesis biomarkers and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4):2949-2965

9 Shen YT, Ruan LL, Lian CX, *et al*. Discovery of HB-EGF binding peptides and their functional characterization in ovarian cancer cell lines[J]. Cell Death Discov, 2019, 5(1):1-11

10 Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication[J]. Semin Diagn Pathol, 1993, 10(4):302-313

11 Ding L, Zhang C, Liu Z, *et al*. Metabonomic investigation of biological effects of a new vessel target protein tTF-pHLIP in a mouse model [J]. J Proteome Res, 2019, 32(4):177-181

12 Jászai J, Schmidt MHH. Trends and challenges in tumor anti-angiogenic therapies[J]. Cells, 2019, 8(9): E1102

13 Xie L, Ji T, Guo W. Anti-angiogenesis target therapy for advanced osteosarcoma[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2):625-636

14 Yeung SC, She M, Yang H, *et al*. Combination chemotherapy including combretastatin A4 phosphate and paclitaxel is effective against anaplastic thyroid cancer in a nude mouse xenograft model[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(8):2902-2909

15 Fujita K, Sano D, Kimura M, *et al*. Anti-tumor effects of bevacizumab in 502 combination with paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2007, 18(1):47-51

16 Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Zarghami N. Tumor vascular infarction: prospects and challenges[J]. Int J Hematol, 2017, 105(3): 244-256

17 Shi Q, Zhang Y, Liu S, *et al*. Specific tissue factor delivery using a tumor-homing peptide for inducing tumor infarction[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 156:501-510

18 Singh M, Ferrara N. Modeling sand predicting clinical efficacy for drugs targeting the tumor milieu[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(7): 648-657

19 Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors[J]. J Cell Biol, 2010, 188(6):759-768

20 Fu XH, Li J, Zou Y, *et al*. Endostar enhances the antineoplastic effects of combretastatin A4 phosphate in an osteosarcoma xenograft [J]. Cancer Lett, 2011, 312(1):109-116

(下转第 144 页)

因启动子异常甲基化而失活，sFRP1 表达降低，不能与 Fz4 结合形成 CRD 二聚体或竞争性结合 Wnt 配体，Fz4 表达增加，Wnt 信号活性增强，进一步激活下游肿瘤靶基因如 Cyclin D1、c－Myc、Axin2、Msl1 的转录，最终导致儿童 ALL 的发生[14～16]；诱导化疗通过去甲基化恢复了 sFRP1 的表达，故完全缓解 ALL 患儿和 ITP 患儿，sFRP1 和 Fz4 的表达差异无统计学意义。

危险度分层是儿童 ALL 预后独立危险因素，不同危险度分层患儿接受化学药物治疗的强度亦不同[17]。本研究发现初发高危、中危 ALL 患儿 sFRP1 mRNA 和蛋白表达均低于低危患儿，初发高危、中危 ALL 患儿 Fz4 mRNA 和蛋白表达均高于低危患儿，初发高危、中危 ALL 患儿两因子表达差异无统计学意义，可能因为不同危险程度 ALL 患儿 sFRP1 基因 CpG 岛甲基化倾向性不同，低危组患儿 sFRP1 基因具有更高的表达活性，具体机制尚需进一步研究[18]。

综上所述，研究认为，Wnt 通路中 Fz4 表达升高、sFRP1 表达降低参与了儿童 ALL 的发病，两因子的表达定量对疾病的评估和治疗有重要临床指导意义。

参考文献

1 Steliarova－Foucher E, Colombet M, Ries LAG, *et al*. International incidence of childhood cancer, 2001－10: a population－based registry study[J]. Lancet Oncol, 2017, 18(6): 719－731

2 Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century[J]. Blood, 2009, 113(7): 1408－1411

3 Nusse R. Wnt/β－catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985－999

4 高吉照，赵继鸥，谭英. Wnt 通路中 Wif－1 和 β－catenin 在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达[J]. 中国当代儿科杂志，2016，18(9)：835－839

5 谭英，高吉照，赵继鸥. 儿童急性淋巴细胞白血病患者骨髓细胞中 Wnt/β－catenin 基因表达水平的研究[J]. 吉林医学，2016，37(10)：2441－2443

6 王文鹏，郭雷，李艳，等. Wnt 通路中散乱蛋白在儿童急性淋巴细胞白血病中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志，2019，21(5)：411－414

7 中华医学会儿科学分会血液学组，《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议[J]. 中华儿科杂志，2013，51(5)：382－384

8 中华医学会儿科学分会血液学组，《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第四次修订)[J]. 中华儿科杂志，2014，52(9)：641－644

9 Niehrs, Christof. The complex world of WNT receptor signalling[J]. Nature reviews. Mol Cell Biol, 2012, 13(12): 767－779

10 Janda CY, Waghray D, Levin AM, *et al*. Structural basis of Wnt recognition by frizzled[J]. Science(NewYork, N. Y.), 2012, 337(6090): 59－64

11 Cai H, Chen Y, Yang X, *et al*. Let7b modulates the Wnt/β－catenin pathway in liver cancer cells via downregulated frizzled4[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1010428317716076

12 Lavergne E, Hendaoui I, Coulouarn C, *et al*. Blocking Wnt signaling by SFRP－like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active ｜[beta]｜－catenin[J]. Oncogene, 2011, 30(4): 423

13 徐成波，沈建箴，沈松菲，等. 分泌型卷曲相关蛋白基因启动子甲基化状态检测在急性白血病中的意义[J]. 中华内科杂志，2010，49(9)：769－771

14 Zhang Y, Tan Y, Wang H, *et al*. Long non－coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) enhances proliferation, migration, and epithelial－mesenchymal transition (EMT) of pituitary adenoma cells by activating β－catenin, c－myc, and cyclin D1 expression[J]. Med Sci Moni, 2019, 25: 7652－7659

15 Jho EH, Zhang T, Domon C, *et al*. Wnt/beta－catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(4): 1172－1183

16 Spears E. Novel double－negative feedback loop between adenomatous polyposis coli and Musashi1 in colon epithelia[J]. J Biol Chem, 2011, 286(7): 4946－4950

17 陆海燕. 儿童急性淋巴细胞白血病的长期随访和预后分析[J]. 中国实用医刊，2018，45(11)：43－46

18 Fan SC, Zou JX, Xu HB, *et al*. Predicted methylation landscape of all CpG islands on the human genome[J]. Chin Sci Bull, 2010, 55(22): 2353－2358

(收稿日期：2019－10－10)
(修回日期：2019－11－24)

(上接第 112 页)

21 Bussolati B, Grange C, Tei L, *et al*. Targeting of human renal tumor－derived endothelial cells with peptides obtained by phage display[J]. J Mol Med, 2007, 85(8): 897－906

22 Arap W, Haedicke W, Bernasconi M. Targeting the prostate for destruction through a vascular address[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(3): 1527－1531

23 Sharma S, Mann AP, Mölder T, *et al*. Vascular changes in tumors resistant to a vascular disrupting nanoparticle treatment[J]. J Control Release, 2017, 268(3): 49－56

24 管明强，史占军，姜勇，等. 体内筛选骨肉瘤血管内皮特异性结合肽[J]. 中华实验外科杂志，2009，26(12)：1763

(收稿日期：2019－11－12)
(修回日期：2019－11－27)