

引文格式:费远丽,高文,杨光.不同移植方式对小鼠恶性黑色素移植瘤的生长及其血管生成的影响[J].

眼科新进展,2015,35(4):326-329. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0087

【实验研究】

不同移植方式对小鼠恶性黑色素移植瘤的生长及其血管生成的影响[△]

费远丽 高文 杨光

作者简介:费远丽,女,1988年5月
出生,山西晋城人,硕士。联系电
话:18322103687; E-mail:461476851
@qq.com

About FEI Yuan-Li: Female, born in
May, 1988. Master degree. Tel:
18322103687; E-mail: 461476851 @
qq.com

收稿日期:2014-07-28

修回日期:2014-11-13

本文编辑:周志新

△基金项目:天津中医药大学第一
附属医院“拓新工程”基金科研课题
(编号:546)

作者单位:300073 天津市,天津中
医药大学(费远丽);300193 天津
市,天津中医药大学第一附属医院
眼科(高文,杨光)

通讯作者:高文, E-mail: gaowenxiu-
wen@163.com

Received date: Jul 28, 2014

Accepted date: Nov 13, 2014

Foundation item: First Affiliated Hos-
pital of Tianjin University of Tradition-
al Chinese Medicine “Extension of
New Projects” Fund Research Projects
(No:546)

From the Tianjin University of Tradition-
al Chinese Medicine (FEI Yuan-
Li), Tianjin 300073, China; Depart-
ment of Ophthalmology, the First Affili-
ated Hospital of Tianjin University of
Traditional Chinese Medicine (GAO
Wen, YANG Guang), Tianjin
300193, China

Responsible author: GAO Wen, E-
mail: gaowenxiuwen@163.com

those in the subcutaneous group, but the difference was not statistically significant (all $P > 0.05$). At 15 days, 21 days and 27 days, the serum levels of IL-17, IL-23 and VEGF in the subcutaneous group were higher than those in the vitreous group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.001$). **Conclusion** The tumor related inflammation factor IL-17, IL-23 as a new target for immunotherapy of malignant melanoma, the whole course of anti-inflammatory therapy will provide a new idea for the treatment of ocular and cutaneous melanoma, and early actively treatment of intraocular melanoma with anti-inflammatory drug is particularly important.

【关键词】 恶性黑色素移植瘤;血管生成;血管内皮生长因子;白细胞介素17;白细胞介素23

【摘要】 目的 研究不同移植方式(玻璃体移植、足垫皮下移植)对小鼠恶性黑色素移植瘤的生长及其血管生成的影响,并初步探讨炎症因子对此两种不同移植瘤的作用机理。方法 40只C57BL-6J小鼠编号后按照随机数字表法分成两组:玻璃体组20只、足垫皮下组20只。分别接种黑色素瘤B16F10细胞于左眼玻璃体和右足垫皮下,然后对肿瘤的发生率及瘤体的基本特征进行27d连续观察;分别于接种后9d、15d、21d、27d取小鼠血清,ELISA检测血清中IL-17、IL-23、VEGF含量;接种后28d处死全部小鼠,摘取肿瘤组织称瘤质量,HE染色观察肿瘤病理特征及其肝、肺转移情况。结果 两组小鼠肿瘤发生率均为

Effects of different transplantation methods on growth and angiogenesis of transplanted tumor of malignant melanoma in mice

FEI Yuan-Li, GAO Wen, YANG Guang

【Key words】 transplanted tumor of malignant melanoma; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; interleukin 17; interleukin 23

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of different transplantation methods (intravitreal transplantation, subcutaneous transplantation) on the growth and angiogenesis of transplanted tumor of malignant melanoma in mice, and explore the mechanism of inflammatory factor in two different transplanted tumor. **Methods** Forty C57BL-6J mice were randomly divided into intravitreal group and subcutaneous group, 20 cases in each group. B16F10 melanoma cells were inoculated in the vitreous of left eye and the pad subcutaneous of right foot, then the basic characteristic of tumor and tumor incidence were observed continuously for 27 days. At 9 days, 15 days, 21 days and 27 days after inoculated, the specimens from the serum of mice were collected, the serum levels of interleukin 17 (IL-17), interleukin 23 (IL-23), vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by ELISA. At 28 days after inoculated, all mice were sacrificed, then the tumor were extracted and weighed, HE staining was used to observe the pathological features and liver, lung metastasis. **Result** The tumor successful rate of two groups were all 100%. The liver and lung metastases in the vitreous group were significantly greater than those in the footpad subcutaneous group, the differences were statistically significant ($\chi^2 = 6.67, 6.67$, both $P < 0.01$). Average tumor appearance time in vitreous cavity of mice (8.70 ± 2.27) days was earlier than that in the average footpad subcutaneous (8.95 ± 0.22) days, but no significant difference was found between the two groups ($t = 0.49, P > 0.05$). At 27 days after transplantation, the body mass of the vitreous group (18.80 ± 2.42) g was lower than that of the footpad subcutaneous group (20.20 ± 1.44) g, and the difference was statistically significant ($t = 2.22, P < 0.05$). The average tumor mass of the vitreous group (3.51 ± 0.58) g was higher than that of the footpad subcutaneous group (3.18 ± 0.62) g, but the difference was not statistically significant ($t = 1.74, P > 0.05$). The serum levels of IL-17, IL-23 and VEGF were gradually increased with the time prolong, the serum levels of IL-17, IL-23 and VEGF at 9 days in the vitreous group were higher than those in the subcutaneous group, but the difference was not statistically significant (all $P > 0.05$). At 15 days, 21 days and 27 days, the serum levels of IL-17, IL-23 and VEGF in the subcutaneous group were higher than those in the vitreous group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.001$). **Conclusion** The tumor related inflammation factor IL-17, IL-23 as a new target for immunotherapy of malignant melanoma, the whole course of anti-inflammatory therapy will provide a new idea for the treatment of ocular and cutaneous melanoma, and early actively treatment of intraocular melanoma with anti-inflammatory drug is particularly important.

100%。玻璃体组肝、肺转移发生率均显著大于足垫皮下组,差异均有统计学意义($\chi^2=6.67,6.67$,均为 $P<0.01$)。玻璃体组小鼠肿瘤出现时间(8.70 ± 2.27)d早于足垫皮下组(8.95 ± 0.22)d,但两组间差异无统计学意义($t=0.49,P>0.05$);27 d时玻璃体组小鼠体质量(18.80 ± 2.42)g较足垫皮下组小鼠(20.20 ± 1.44)g减轻更明显,且两组差异有统计学意义($t=2.22,P<0.05$);玻璃体组小鼠肿瘤组织质量(3.51 ± 0.58)g高于足垫皮下组(3.18 ± 0.62)g,但两组差异无统计学意义($t=1.74,P>0.05$)。接种后随着时间的推移两组小鼠血清中的IL-17、IL-23、VEGF含量均逐渐升高,9 d时玻璃体组血清IL-17、IL-23、VEGF含量均高于足垫皮下组,但差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$),15 d、21 d及27 d时足垫皮下组血清IL-17、IL-23、VEGF含量均高于玻璃体组,差异均有显著统计学意义(均为 $P<0.001$)。结论 把肿瘤相关炎症因子作为恶性黑色素瘤免疫治疗的新靶点,全程抗炎疗法将为眼内和皮肤黑色素瘤的治疗提供新的思路,且眼内黑色素瘤的早期治疗中积极运用抗炎药物尤为重要。

恶性黑色素瘤是起源于神经嵴的黑色素细胞恶性肿瘤^[1],具有恶性程度高、转移早、死亡率高、术后易复发等特点。然而流行病学、细胞遗传学以及染色体分析研究表明皮肤黑色素瘤与眼内黑色素瘤是两种完全不同的疾病^[2-5],两者在生物学上表现不同可能主要与不同的致病基因、微环境的改变及肿瘤形成过程中各自有不同的肿瘤形成机制有关。目前研究结果尚不足以阐明两种肿瘤的发生机制,因此建立相应的移植瘤模型并初步探讨皮肤黑色素瘤与眼内黑色素瘤发病机制的异同,可为进一步抗肿瘤药物的实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 B16F10 细胞株购自武汉细胞库。SPF级黑色雄性C57BL-6J小鼠40只,由军事医学科学院实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(军)2012-0004,6~8周龄,体质量18~23 g,实验前适应1周,饲养于天津中医药大学第一附属医院动物饲养中心。40只小鼠编号后按照随机数字表法分成2组:玻璃体组20只、足垫皮下组20只。

1.2 细胞培养及悬液配制

1.2.1 细胞培养 参考产品说明书,B16黑色素瘤细胞系采用RPMI_1640培养液(含体积分数10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素及100 μg·mL⁻¹链霉素)培养。取冻存的B16细胞株一支,于37℃水浴箱中震荡约1 min,以1000 r·min⁻¹的速度离心5 min,弃去上清液,取培养瓶1个,加入培养液约4 mL,将培养液吹散至悬浊液,移到培养瓶中,静置于37℃、含体积分数5%CO₂恒温培养箱中培养,观察细胞长满瓶底80%时,吸净培养液,加入2.5 g·L⁻¹胰蛋白酶消化液约1 mL,显微镜下观察细胞漂浮或皱缩成类圆形时加入培养液终止消化,并反复吹打至细胞完全脱落。将细胞悬浊液移至15 mL离心管中,以1000 r·min⁻¹的速度离心5 min,弃去上清液,加新鲜培养液将细胞吹散,分别移入培养瓶中,37℃、含体积分数5%CO₂恒温培养箱中静置培养。

1.2.2 细胞悬液的配制 2.5 g·L⁻¹胰蛋白酶消化对数生长期B16细胞,以1000 r·min⁻¹离心5 min。弃去上清液,加0.3 mL生理盐水稀释瘤细胞,随机取5个视野计算活细胞数,生理盐水调整细胞浓度

为20×10⁶ L⁻¹备用。

1.3 肿瘤模型建立

1.3.1 玻璃体内移植瘤模型 造模前3 d小鼠左眼滴氧氟沙星滴眼液,每次1滴,每天3次,50 g·L⁻¹水合氯醛0.004 mL·g⁻¹腹腔注射全身麻醉小鼠,氧氟沙星滴眼液冲洗左眼结膜囊后,盐酸丙美卡因滴眼液1滴表面麻醉,左手固定小鼠,在裂隙灯显微镜下用27号注射针头于周边角膜作隧道穿刺前房并放出少许房水,右手持10 μL微量进样器将4 μL B16黑色素瘤细胞于睫状体平坦部注入玻璃体内,术毕红霉素眼膏涂左眼。术后小鼠左眼均予以氧氟沙星滴眼液,每次1滴,每天3次,滴眼1周。

1.3.2 足垫皮下移植瘤模型 小鼠全身麻醉方法同玻璃体移植瘤模型。麻醉前用碘伏及酒精棉球对小鼠右足进行以足垫皮下为中心的消毒,左手固定小鼠,右手持10 μL微量进样器将4 μL B16黑色素瘤细胞注射于右足垫皮下,出针后按压针孔,以免漏液。术后所有小鼠均予以正常饮食、饮水。

1.4 ELISA法检测血清中IL-17、IL-23及VEGF的含量 参照产品说明书,采集血清尽早检测,设标准孔8孔,每孔中各加入样品稀释液100 μL,待测品孔每孔各加入待测样品100 μL混匀,洗板,加一抗工作液50 μL,37℃,60 min,洗板;37℃温育30 min,洗板;每孔先加入显色剂A 50 μL,再加入显色剂B 50 μL,37℃避光显色15 min,在450 nm处测定光密度(OD)值。计算每个样品的浓度:以标准物的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品OD值由标准曲线查出相应的浓度,检测建模后9 d、15 d、21 d、27 d小鼠血清中IL-17、IL-23、VEGF含量。

1.5 HE染色 建模后28 d处死全部小鼠,摘取接种肿瘤的眼球和足以及小鼠肺、肝等器官于100 g·L⁻¹福尔马林液中固定,作常规石蜡包埋,4 μm组织切片,常规脱蜡,苏木素复染10 min,氨水返蓝,伊红染色3 min后脱水,封片。观察两组小鼠肿瘤发生率、病理特征及其肝、肺转移情况。

1.6 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,计数资料两组间率的比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤的一般情况 玻璃体组小鼠接种瘤细胞后 5 d 左右可在裂隙灯显微镜下观察到黑色素瘤细胞黏附于晶状体后囊膜,形成色素样沉着;7 d 左右发展为前房内可见黑色点状改变、角膜水肿、眼球突出;10 d 左右溃破眼球,且可在眼外继续生长增大(图 1)或可侵及眶内继续生长;小鼠初期精神、活动良好,体质量可见缓慢升高;18 d 左右毛发渐失光泽、活动减少、逐渐消瘦,小鼠肿瘤出现时间为 (8.70 ± 2.27) d。足垫皮下组小鼠接种瘤细胞后 7 d 左右可见小鼠足垫皮下黑色点状、条状、圆团状改变,后逐渐增大(图 2),肿瘤表面未见溃破;在连续观察的 27 d 内除毛发渐失光泽外,小鼠精神、活动情况良好,体质量未见明显改变,小鼠肿瘤出现时间为 (8.95 ± 0.22) d,两组间差异无统计学意义($t = 0.49, P > 0.05$);接种后 27 d 玻璃体组小鼠体质量 (18.80 ± 2.42) g 较足垫皮下组小鼠 (20.20 ± 1.44) g 减轻更明显,且两组差异有统计学意义($t = 2.22, P < 0.05$);接种后 28 d 处死小鼠后摘取肿瘤组织,玻璃体组小鼠肿瘤组织质量 (3.51 ± 0.58) g 高于足垫皮下组 (3.18 ± 0.62) g,但两组差异无统计学意义($t = 1.74, P > 0.05$)。

Figure 1 Tumor ruptured from eyeball, and continually grew at 10 days after inoculated in vitreous group. **Figure 2** Black dot and strip changes with round shape was seen, and then gradually grew at 7 days after inoculated in footpad subcutaneous group **图 1** 玻璃体组小鼠接种瘤细胞 10 d 左右溃破眼球,且可在眼外继续生长增大。**图 2** 足垫皮下组小鼠接种瘤细胞 7 d 左右可见足垫皮下黑色点状、条状、圆团状改变,后逐渐增大

2.2 成瘤率的观察 接种瘤细胞后,40 只小鼠均可见黑色肿物生长,摘取瘤组织后行 HE 染色,确诊为黑色素瘤,肿瘤发生率均为 100%。

2.3 HE 染色观察 玻璃体内移植瘤可见核大深染的黑色素瘤细胞,少有坏死灶,且可见肿瘤新生血管与脉络膜血管相通(图 3),皮下移植瘤可见大量肿瘤坏死灶、出血灶(图 4)。玻璃体组肝转移 16 只(80%),肺转移 12 只(60%),足垫皮下组肝转移 8 只(40%),肺转移 4 只(20%),经 χ^2 检验,玻璃体组肝、肺转移率均高于足垫皮下组,差异均有统计学意义($\chi^2 = 6.67, 6.67$, 均为 $P < 0.01$)。

2.4 血清中 IL-17、IL-23、VEGF 含量比较 建模

Figure 3 Large hyperchromatic nuclei of melanoma cells was seen in vitreous group, tumor blood vessels and choroid blood vessels communicated under optical microscope (hollow arrow, HE, $\times 100$). **Figure 4** Large number of necrosis was seen in footpad subcutaneous group under optical microscope (hollow arrow, HE, $\times 400$) **图 3** 光学显微镜下玻璃体组可见核大深染的黑色素瘤细胞,肿瘤血管与脉络膜血管相通(空心箭头所示,HE, $\times 100$)。**图 4** 光学显微镜下足垫皮下组可见大量坏死灶(空心箭头示,HE, $\times 400$)

后随着时间的推移两组小鼠血清中的 IL-17、IL-23、VEGF 均呈现逐渐升高的趋势,9 d 时玻璃体组血清 IL-17、IL-23、VEGF 含量高于足垫皮下组,但差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$);15 d、21 d 和 27 d 时足垫皮下组血清 IL-17、IL-23、VEGF 含量高于玻璃体组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.001$, 见表 1-3)。

表 1 两组小鼠血清中 IL-17 含量的比较
Table 1 Comparison of IL-17 levels in mice serum between two groups ($\bar{x} \pm s, \rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

Group	9 days	15 days	21 days	27 days
Intravitreal	125.65 ± 11.11	132.80 ± 9.62	147.40 ± 7.96	150.25 ± 7.45
Subcutaneous	120.48 ± 6.86	148.65 ± 11.70	160.30 ± 10.09	174.90 ± 10.97
<i>t</i>	1.77	4.68	4.49	8.31
<i>P</i>	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 两组小鼠血清中 IL-23 含量的比较
Table 2 Comparison of IL-23 levels in mice serum between two groups ($\bar{x} \pm s, \rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Group	9 days	15 days	21 days	27 days
Intravitreal	1.018 ± 0.278	1.042 ± 0.110	1.191 ± 0.115	1.316 ± 0.085
Subcutaneous	0.917 ± 0.008	1.780 ± 0.082	1.925 ± 0.117	2.153 ± 0.176
<i>t</i>	1.62	24.06	20.00	19.15
<i>P</i>	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 两组小鼠血清中 VEGF 含量的比较
Table 3 Comparison of VEGF levels in mice serum between two groups ($\bar{x} \pm s, \rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

Group	9 days	15 days	21 days	27 days
Intravitreal	50.25 ± 9.13	54.50 ± 7.76	66.06 ± 7.92	80.64 ± 5.68
Subcutaneous	45.80 ± 4.63	89.35 ± 8.31	155.90 ± 12.79	170.20 ± 13.47
<i>t</i>	1.94	13.71	26.71	27.40
<i>P</i>	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

在实验肿瘤学研究中,最有利用价值的是近交系小鼠,C57 小鼠为近交系动物,其 B16 黑色素瘤模型具有肿瘤发生率高及模型易建立等优点。本研究将 B16 黑色素瘤细胞接种于 C57BL-6J 小鼠玻璃体内属于同种异体的异位移植,接种于小鼠足垫皮下属于同种异体的原位移植,肿瘤发生率均为 100%,且 C57BL-6J 小鼠来源经济方便,玻璃体移植性黑色

素瘤模型肿瘤接种技术操作简便,可重复性好,可较好地模拟人眼内黑色素瘤的生物学行为,便于进行观察研究。因此,该模型为进一步研究眼内黑色素瘤和皮肤黑色素瘤的发生与发展机制提供了一种较理想的模型。

血管生成是肿瘤发生、发展的必经之路,一方面血管为肿瘤生长提供营养,另一方面血管为肿瘤细胞进入血液循环、发生血道转移提供通路。目前认为 VEGF 是最重要的血管生成因子,多种信号途径如炎症环境、生长因子、癌基因、细胞因子和激素等均可以促进 VEGF 分泌。随着人们对肿瘤免疫学研究的深入,白细胞介素类炎症因子在肿瘤血管生成中的作用日益受到重视。IL-23 是近年来发现的一种同时参与慢性炎症形成和肿瘤发生的细胞因子^[6]。在小鼠肿瘤模型中,敲除 IL-23p19 后,肿瘤组织中微血管密度显著降低^[7]。Ljubic 等^[8]对结肠癌的研究结果显示,血清中 IL-23 的水平与组织中 VEGF 的水平密切相关,血清 IL-23 含量较高的组织中 VEGF 表达水平高于血清 IL-23 含量较低的组织。Kato 等^[9]首次证实了 IL-17 是一个血管生成因子,能促进肿瘤生长,是一种具有促炎作用的细胞因子。王倩等^[10]发现 IL-17 可以诱导 B16 细胞分泌 VEGF- α 。Wang 等^[11]通过 B16 鼠黑色素瘤模型证实 IL-17 可上调促血管生成因子 VEGF 表达而促进肿瘤生长。Liu 等^[12]发现结肠癌组织中 IL-17 水平与 VEGF 表达正相关。房东亮等^[13]建立慢性炎症-黑色素瘤复合动物模型,其相关分析结果显示,小鼠血清中 IL-17、IL-23 含量与 VEGF 及 MVD 具有较好的正相关性 ($P < 0.01$),从而推测这些炎症因子的释放可能会通过某些机制促进 VEGF 的分泌。在众多体内外实验结果及临床报道前提下,我们通过检测玻璃体内移植瘤与足垫皮下移植瘤小鼠血清中的 IL-17、IL-23 及 VEGF 含量,探讨不同移植方式对小鼠恶性黑色素移植瘤的生长及其血管生成的影响,并初步探索炎症细胞因子对此两种不同移植瘤的作用机理,以期为临床治疗提供新的思路。

本实验结果显示,两组小鼠恶性黑色素瘤血清中的 IL-17、IL-23 炎症细胞因子随着时间推移均逐渐升高,小鼠血清中 IL-17、IL-23 炎症细胞因子的升高会通过某种途径促进 VEGF 分泌,进而促进肿瘤血管的生成而参与黑色素瘤移植瘤的形成全过程,接种后 9 d,两组血清中的 IL-17、IL-23 含量差异无统计学意义,且两组肿瘤平均出现时间均为 9 d 左右,笔者推测此时可能正是肿瘤组织由无血管期向血管期过渡。接种后 15 d、21 d 和 27 d 时玻璃体组小鼠血清中的 IL-17、IL-23 含量低于足垫皮下组,眼内移植瘤肿瘤质量及肺、肝转移率均高于皮下移植瘤,笔者推测其原因可能与玻璃体肿瘤血管与机体

脉络膜血管血液循环逐渐沟通有密切的关系,脉络膜血液主要来自睫状后短动脉,其血管多、血容量大,约占眼球血液总量的 65%,有眼球血库之称,此后眼内移植瘤的生长与转移可能是肿瘤新生血管逐渐与机体脉络膜血管血液循环沟通后两者共同作用的结果。眼内移植瘤肿瘤质量及肺、肝转移率均高于皮下移植瘤,其原因可能与脉络膜有丰富的血管有密切关系,且肿瘤细胞主要经血运转移,HE 观察眼内肿瘤坏死灶较少,证实眼内移植性黑色素瘤的血供较好,且可见肿瘤新生血管与脉络膜血管相通,故其可能对于肿瘤的发生与转移具有特殊意义。而足垫皮下组移植瘤发生在皮肤,组织易处于缺血状态,HE 染色可见大量坏死灶、出血灶也证实了这一点,IL-17、IL-23 始终升高进而促进 VEGF 的分泌,对于维持肿瘤的生长意义重大。因此,把肿瘤相关性炎症因子作为恶性黑色素瘤免疫治疗新的靶点,全程抗炎疗法的应用将为眼内黑色素瘤和皮肤黑色素瘤的治疗提供新的思路,且早期积极运用抗炎药物在眼内黑色素瘤的治疗中尤为重要。

参考文献

- 1 Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: date from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry [J]. *Arch Dermatol*, 1999, 135(3): 275-280.
- 2 Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(17): 1341-1348.
- 3 Singh AD, Tubbs R, Biscotti C, Schoenfield L, Trizzoi P. Chromosomal 3 and 8 status within hepatic metastasis of uveal melanoma [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(8): 1223-1227.
- 4 Yu GP, Hu DN, McCormick SA. Latitude and incidence of ocular melanoma [J]. *Photochem Photobiol*, 2006, 82(6): 1621-1626.
- 5 Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 851-857.
- 6 田原, 马跃美, 刘艳荣, 房东亮, 赵秀兰. 炎症因子 IL-23 对黑色素瘤 B16F10 细胞增殖和侵袭能力的影响 [J]. *天津医科大学学报*, 2014, 20(1): 8-10.
- 7 Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth [J]. *Nature*, 2006, 442(7101): 461-465.
- 8 Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, et al. Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(3): 182-189.
- 9 Kato T, Furumoto H, Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, et al. Expression of IL-17 mRNA in Ovarian Cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(3): 735-738.
- 10 王倩. IL-17 对小鼠黑色素瘤细胞体外 VEGF- α 表达和血管生成拟态的影响 [D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- 11 Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(7): 1457-1464.
- 12 Liu J, Duan Y, Cheng X, Liu J, Duan Y, Cheng X, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(2): 348-354.
- 13 房东亮, 马跃美, 赵秀兰, 孙涛, 刘艳荣, 王倩, 等. 慢性炎症对小鼠黑色素瘤血管生成的影响 [J]. *天津医药*, 2013, 41(3): 230-233.