

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.16.001

• 基础研究 •

人源化 YKL-40 中和抗体(Rosazumab) 体外阻断血管再生*

韩笑¹ 朱博文¹ 罗静¹ 陈慧¹ 虞海惠¹ 邵荣^{1,2Δ}

(1 上海交通大学基础医学院药理学与化学生物学系 上海 200025;

2 上海市胆道疾病重点实验室,上海交通大学医学院附属新华医院 上海 200092)

摘要 目的: 血管再生是实体肿瘤的生长和恶性转移的一个必须病理过程, 阻断这一过程能够有效阻止恶性肿瘤的发生发展。YKL-40 是血管再生因子, 能刺激肿瘤的血管再生。本文探讨了一个原创性人源化抗 YKL-40 单克隆抗体(Rosazumab, 命名为洛沙单抗)阻断 YKL-40 血管生成的体外功能。**方法:** Western Blot 检测洛沙单抗对分泌和重组 YKL-40 蛋白的特异性结合; Western Blot 及考马斯亮蓝染色检测该抗体的抗体特异性和纯度; Live/Dead 染色试验检测抗体的细胞毒性。以人微血管内皮细胞(Human microvascular endothelial cells, HMVECs)为研究对象, 引入重组 YKL-40 蛋白或脑胶质瘤细胞(Glioblastoma serum-differentiated cells, GSDCs)的条件培养基进行培养。Transwell 试验检测该抗体对 HMVECs 迁移力的影响, 并用 Matrigel 试验检测对微管形成的作用。**结果:** 洛沙单抗可特异性结合 YKL-40, 考马斯亮蓝染色进一步证明其纯度及特异性。体外血管再生试验包括细胞迁移力和微管形成证明该抗体可以有效中和重组 YKL-40 蛋白及肿瘤细胞条件培养基中的 YKL-40, 抑制 HMVECs 的迁移和血管形成。**结论:** 洛沙单抗是首创的人源化中和 YKL-40 的抗体, 其特异性高, 细胞毒性低, 能显著抑制 YKL-40 血管再生功能, 为下一步体内试验奠定基础。本研究可为 YKL-40 诱导的肿瘤血管生成及恶性肿瘤转移提供一种新的治疗手段。

关键词: YKL-40; 人源抗体; 血管生成; HMVECs; 肿瘤转移

中图分类号: R-33; R730.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)16-3001-06

Inhibition of a Humanized YKL-40 Neutralizing Antibody (Rosazumab) on Angiogenesis *in Vitro**HAN Xiao¹, ZHU Bo-wen¹, LUO Jing¹, CHEN Hui¹, YU Hai-hui¹, SHAO Rong^{1,2Δ}

(1 Department of pharmacology and chemical biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China; 2 Shanghai Key Laboratory of Biliary Tract Disease Research, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: Angiogenesis is a key pathologic process for the development and metastasis of solid tumors. Blocking this event can effectively prevent tumor development and malignant transformation. A secreted protein YKL-40 is an angiogenic factor. In this study, we created a new humanized anti-YKL-40 monoclonal antibody, named Rosazumab, and investigated its effects on angiogenesis induced by YKL-40 *in vitro*. **Methods:** Western blot was engaged to define the specific binding of Rosazumab to YKL-40. The specificity and purity of Rosazumab were also analyzed by Western blot and Coomassie blue staining. Live/Dead staining was used to determine cytotoxicity of this antibody. Rosazumab was introduced to human microvascular endothelial cells (HMVECs) in Transwell to detect the effect on the cell migration, and in Matrigel to detect the effect on microtubule formation in the presence of recombinant protein YKL-40 or conditioned medium from brain tumor cell line GSDC. **Results:** Western blot showed that Rosazumab specifically recognized YKL-40, Coomassie brilliant blue staining further confirmed its purity and specificity. Live/dead study did not exhibit the cytotoxicity of different doses of Rosazumab to the cells. Transwell assay showed that the antibody effectively blocked HMVEC migration and tube formation by neutralizing recombinant protein YKL-40 and the YKL-40 in the conditioned medium of GSDC. **Conclusions:** Rosazumab, the first humanized YKL-40 monoclonal antibody has high specificity to bind to YKL-40 and low cytotoxicity. The antibody can effectively inhibit angiogenesis induced by YKL-40 *in vitro*, which lays the foundation for the following studies *in vitro*. Therefore, our study may provide a new therapeutic tool targeting YKL-40-induced tumor angiogenesis and subsequent metastasis of malignant tumors in the future.

Key words: YKL-40; Humanized antibody; Angiogenesis; HMVECs; Tumor metastasis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)16-3001-06

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81772512); 上海市科委科研基金项目(20S11901700);

上海交通大学附属新华医院基金项目(J2PI201716)

作者简介: 韩笑(1996-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: YKL-40 在肿瘤进展中的作用, E-mail: Hannie118@163.com

Δ 通讯作者: 邵荣, 男, 博士生导师, 研究员, 主要研究方向: YKL-40 在肿瘤进展中的作用, E-mail: rongshao@sjtu.edu.cn

(收稿日期: 2021-01-31 接受日期: 2021-02-27)

前言

Folkman J. 在 1971 年首次提出实体肿瘤直径超过 1-2 mm 时,必须需要新生微血液循环,肿瘤组织才能发展,这个新生血液的病理过程称之为血管再生(Angiogenesis),即指由宿主原有血管内皮细胞(Endothelial cells)的繁殖、迁移,在肿瘤中形成新型微循环结构^[1]。血管再生能保障肿瘤细胞生长所需的营养物质和氧气,同时清除代谢废物。长期以来,血管再生已被确认是肿瘤发展和转移的必要途径^[2,3]。因此,多种抗血管再生药相继诞生问世。抗血管再生药主要分为小分子化学合成药和免疫性人源化单克隆抗体的二类靶向药。由于前者有多靶向的非特异性,细胞毒性大,副作用明显,因而临床应用十分谨慎;而人源化抗体有较强的特异靶向性,副作用小,因此有较好的疗效。但是,后者研发周期长,需利用基因工程和细胞培养等技术;另外,抗体的分离、纯化及特异性要求高而复杂,研制难度大,因而药物有限。后者典型的药物有人源化抗 VEGF 抗体(Bevacizumab,贝伐单抗)和 VEGFR 抗体(Ramucirumab,雷莫芦单抗)^[4-6]。小分子拮抗剂包括 VEGF 受体(Sunitinib)、EGF 受体(Gefitinib)、PDGF 受体(Imatinib)等阻断剂^[7]。虽然这两类药在肿瘤治疗中均取得了显著疗效;但是,不难发现反复使用或单个使用,肿瘤会快速产生耐药,甚至肿瘤的血管增生再次出现反弹,导致肿瘤迅速发展恶化,危及生命^[8,9]。由此,目前临床已建议多个血管再生阻断剂的联合用药。

YKL-40 是一种分泌型糖蛋白,其分子量为 40KDa。正常生理状态时,人体多种细胞表达 YKL-40,如软骨细胞、滑膜细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞;其生理功能是调节结缔组织的细胞生长和血管内皮细胞的迁移^[10,11]。但其正常生理表达的水平是明显低于病理情况时 YKL-40 的分泌量,因此,病人血液浓度 YKL-40 的升高引起了研究人员的极大关注,尤其是肿瘤转移的晚期病人;这时段的肿瘤通常含有丰富血管再生的病理特征。十多年来,临床研究已报道 YKL-40 的表达与肿瘤恶变有显著的相关性。例如乳腺癌,大肠癌,肺癌等转移性癌症以及恶性脑肿瘤患者均被发现 YKL-40 血浓度显著升高^[12-16];而且,高浓度的 YKL-40 与肿瘤的转移和患者的低存活率是密切相关的,这提示 YKL-40 可作为晚期癌症的标志物^[17]。然而,YKL-40 在肿瘤发展中的病理机制的研究却十分有限。我们首次报道了 YKL-40 是肿瘤血管再生因子,能促进乳腺癌、直肠癌、脑肿瘤的内皮细胞产生新生血管,导致肿瘤发展^[18]。在此基础上,我们研发了鼠源性抗 YKL-40 抗体(mAY),发现 mAY 能特异结合 YKL-40 并阻断 YKL-40 的抗血管再生和抗肿瘤生长的功能^[19],提示研发人源化抗 YKL-40 抗体是一个前景广的抗肿瘤血管再生靶向药,这可能对晚期癌症病人有潜在的疗效。因此,在 mAY 的基础上,通过美国 Creative lab 抗体制造公司我们研发了人源化抗 YKL-40 抗体(命名为 Rosazumab,洛沙单抗)。本文我们研究了洛沙单抗在体外对 YKL-40 血管再生的阻断作用,研究结果对下一步进入体内功能检测奠定了重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

胶质母细胞瘤 U87 购自 ATCC(美国),胶质母细胞瘤 GS-DC 和血管内皮细胞株 HMVEC 由本课题组自己构建^[19]。DMEM/FBS 购自美国 Themorfisher 公司;内皮细胞基础培养基 EBM2 购自澳洲 Lonsa 公司,BSA 和皮质醇购自德国 Sigma 公司,胰酶购自美国 HyClone 公司;Live/Dead 检测试剂 Calcein AM 和 Ethidium homodimer 购自美国 Themor fisher 公司;YKL-40 蛋白由本实验室自行纯化^[18]。基质胶(Matrigel)购自于美国 BD 公司;Transwell 小室及细胞培养皿、细胞培养孔板购自美国 Corning 公司。蛋白浓缩装置 Minimate™ TFF System 购自美国 Life Sciences 公司。EGF 和 1 ×青霉素/链霉素购自于 Sigma 公司。Protein A MAPS II kit 购自于美国 BioRad 公司,PD-10 脱盐柱购自美国 Amersham 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 HMVECs 是采用内皮细胞培养基 EBM2+10%FBS+1 μg/mL 皮质醇+10 ng/mL EGF+1 ×青霉素/链霉素培养。GSDCs 和 U87 使用 DMEM+10%FBS+1 ×青霉素/链霉素培养。

1.2.2 洛沙单抗的研制 在我们的授权下,美国 Creative Biolab 进行了洛沙单抗的制备。简述如下:表达鼠源性抗 YKL-40 抗体(mAY)的杂交瘤 B 淋巴细胞被收集和分离细胞 RNA。抗体的重链和轻链 DNA 序列包含 CDRs(Complementarity determining regions)区域通过 RT-PCR 被反转录和扩增;然后,利用 silico CDR-grafting 技术就该鼠源 CDR 的 DNA 序列引入于人源型重链和轻链的 DNA 质粒中,随之这些重链和轻链的不同组合最后引入到 pFuse-hIgG1-Fc2 vector,并转入于 293F 细胞。在 15 个不同组合的 Fc 片段的候选者中,筛选出一个与 YKL-40 亲和力最强的候选者,最终将该 DNA 引入 hIgG1 质粒,就形成整个完整类似于人源抗体 IgG 的嵌合抗体 DNA。该 DNA 转入于 CHO-S 细胞,细胞培养液含有分泌的洛沙单抗即被收集。

浓缩和分离洛沙单抗:使用 Minimate™ TFF System 将收集的 2.5 L CHO-S 上清液浓缩至 30 mL。使用 protein A MAPS II kit 将浓缩的抗体进行人源 IgG 的纯化。之后用 PD-10 脱盐柱将纯化后的抗体从含高盐的洗脱液置换入 PBS 中,分装后放入 -80℃冻存。

1.2.3 Western blot 检测洛沙单抗的特异性 将 5 μg 重组 YKL-40 蛋白和 30 μL 的胶质瘤细胞 U87 上清(含分泌 YKL-40)进行 SDS-PAGE。转膜、封闭后,用洛沙单抗(20 μg/mL)过夜,之后使用抗人源性 HRP-conjugated 的二抗在室温孵育 2 小时,最后使用化学发光试剂进行曝光。为了确认洛沙单抗的分子大小,我们将 1 μg 人 IgG 和洛沙单抗(0.5 μg、1 μg)在有或无还原剂(DDT)的上样缓冲液中进行 SDS-PAGE 电泳检测,以及后续的转膜、封闭。之后使用上述抗人源二抗室温孵育 2 小时,使用化学发光液进行显影。

1.2.4 考马斯亮蓝染色法检测抗体纯度和浓度 为了检测分离后洛沙单抗的纯度和浓度,我们将 BSA (1 μg、10 μg、100 μg)为标准蛋白以及洛沙单抗(15 μL、30 μL)进行常规 SDS-PAGE 电泳,电泳完毕后加入考马斯亮蓝染色液染色过夜,然后加入脱色液(甲醇:乙酸:水 4.5:0.5:5)缓慢进行脱色和

拍照。

1.2.5 Live/Dead 染色检测抗体对 HMVECs 的细胞毒性 将 HMVECs 细胞在呈对数期生长时,种入于 96 孔板进行常规培养,待细胞长至 80%时,改用无血清培养基,分别加入 0、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的 hIgG 或洛沙单抗,培养 72 小时后,加入 Live/Dead 检测试剂 Calcein AM (1:2000) 及 Ethidium homodimer(1:500),37℃ 培育 30 分钟后,用荧光显微镜拍照。分析活细胞(绿色)和死细胞(红色)的荧光图像并计数。

1.2.6 Transwell 细胞迁移实验 当 HMVECs 细胞呈对数期生长时,用胰蛋白酶消化,用无血清培养基重悬。按照每孔 4×10^4 个细胞接种在 Transwell 24 孔板上室,在下室中加入 600 μL 含 10%FBS 常规培养基。18 小时后用多聚甲醛固定 20 分钟,结晶紫染色 2 小时,PBS 清洗三次后,随机选取视野进行拍照计数。

1.2.7 Matrigel 基质胶微管形成实验 当 HMVECs 细胞呈对数期生长时,用胰蛋白酶消化离心并计数。将 Matrigel 基质胶 (10 mg/mL)置于冰上融化。在 96 孔板中每孔加入 50 μL 基质胶,37 度下放置 30 分钟。当基质胶凝固后,在 hIgG 或洛沙单抗处理的肿瘤细胞 GSDC 条件培养基(Conditioned medium)存在下,将 HMVECs(1×10^4 细胞)转移到基质胶上。温育 16 小时后,分析管形成结构。从每个样品随机选取三个视野,计算生成微管的平均值。

1.3 统计学分析

试验结果用 SPSS 22.0 进行统计,统计图用 GraphPad Prism 8.0 软件制作,采用 t 检验进行两组间比较,单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较, $P < 0.05$ 时即视为具有统计学差异。

2 结果

2.1 洛沙单抗与 YKL-40 特异性结合

为了检测洛沙单抗能与 YKL-40 蛋白特异性结合,我们首先采用 Western Blot 鉴定此抗体能否辨认 YKL-40。结果显示洛沙单抗不仅能辨认纯化的重组 YKL-40 蛋白,而且也能辨认肿瘤细胞 U87 分泌的 YKL-40 (图 1A)。与单一体外重组 YKL-40 蛋白相比,肿瘤细胞分泌的 YKL-40 出现两条带,下面条带是非修饰的 YKL-40,而上面可能为糖基化修饰的 YKL-40。在对洛沙单抗进行 Western Blot 后,该抗体在用 DTT 还原剂处理后,抗体的重链 IgG 显示在 50 KDa 位置;而在非 DTT 处理时,重链与轻链结合的整个抗体分子位置在 150 KDa,与正常人源 IgG 完全一致(图 1B),证明洛沙单抗是高度纯化的人源化抗体。在对洛沙单抗进行定量时,我们采用考马斯亮蓝染色,发现 15 μL 的抗体含量相当于 10 μg 的 BSA 蛋白(图 1C),因此,纯化后洛沙单抗的浓度为 0.67 $\mu\text{g/L}$ 。

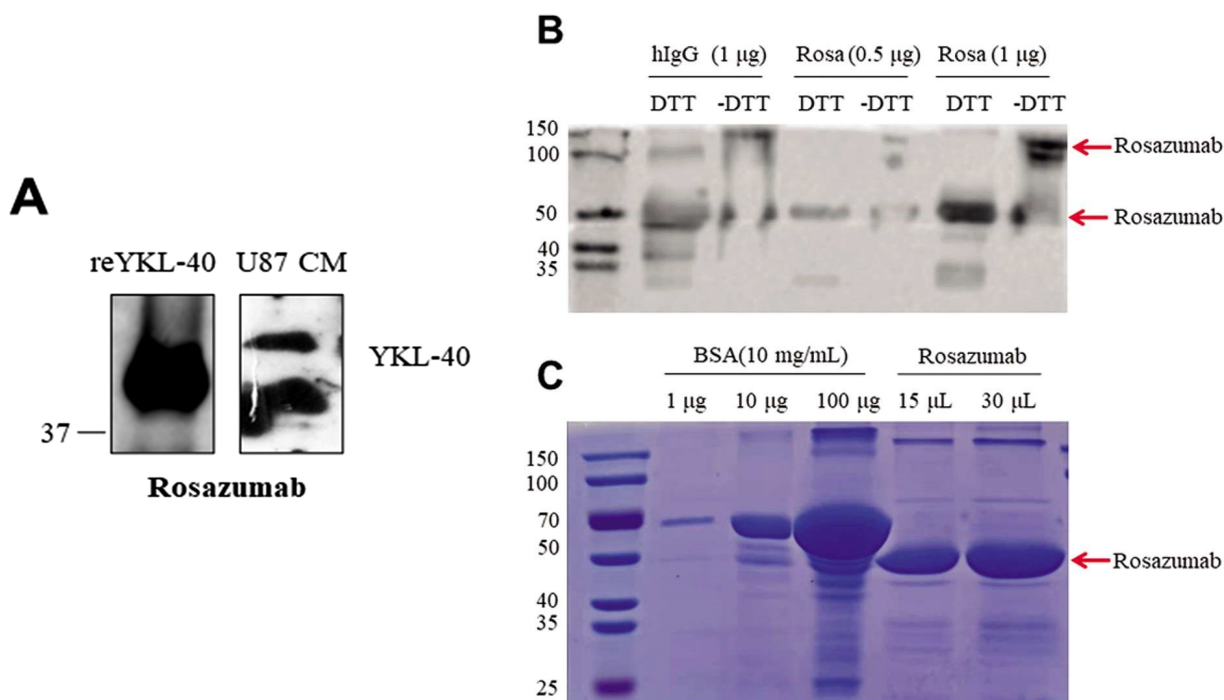


图 1 人源化 YKL-40 抗体与 YKL-40 的特异性结合

Fig.1 Specific binding of humanized YKL-40 antibody to YKL-40

A. The specific binding of Rosazumab to YKL-40 was detected by Western blot.

B. The purity of Rosazumab was analyzed by Western blot. C. Coomassie blue staining was used to quantify the antibody.

2.2 洛沙单抗对 HMVEC 无细胞毒性

为了确认洛沙单抗是否对 HMVEC 具有细胞毒性,我们采用不同浓度的抗体,加入于 HMVEC(图 2A)。参照以往我们使用中和抗体进行体外实验的相关研究,抗体阻断作用的剂量是 10-20 g/mL ,时间是 24-48 小时^[10]。因此,我们采用 0-40 g/mL

的梯度,由结果可知,与加入相同浓度 hIgG 的对照组相比,洛沙单抗各种剂量对细胞死亡数目无显著性差异(图 2A)。图 2B 显示了当浓度为最高浓度 40 g/mL 时洛沙单抗和对照 hIgG 的作用。结果表明该人源化 YKL-40 抗体对 HMVEC 无细胞毒性。

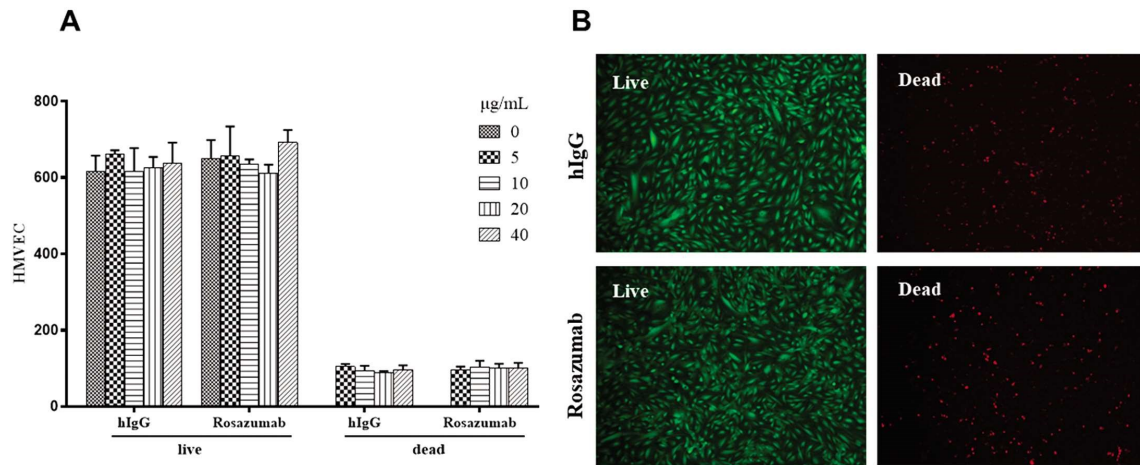


图2 不同浓度洛沙单抗条件下的细胞毒性比较

Fig.2 Comparison of cytotoxicity under different concentrations of Rosazumab.

A. Comparison of the cytotoxicity with different concentrations of Rosazumab, n=3. B. Effects of hIgG or Rosazumab(40 mg/mL)on HMVEC viability for 72h in SF, n=3.

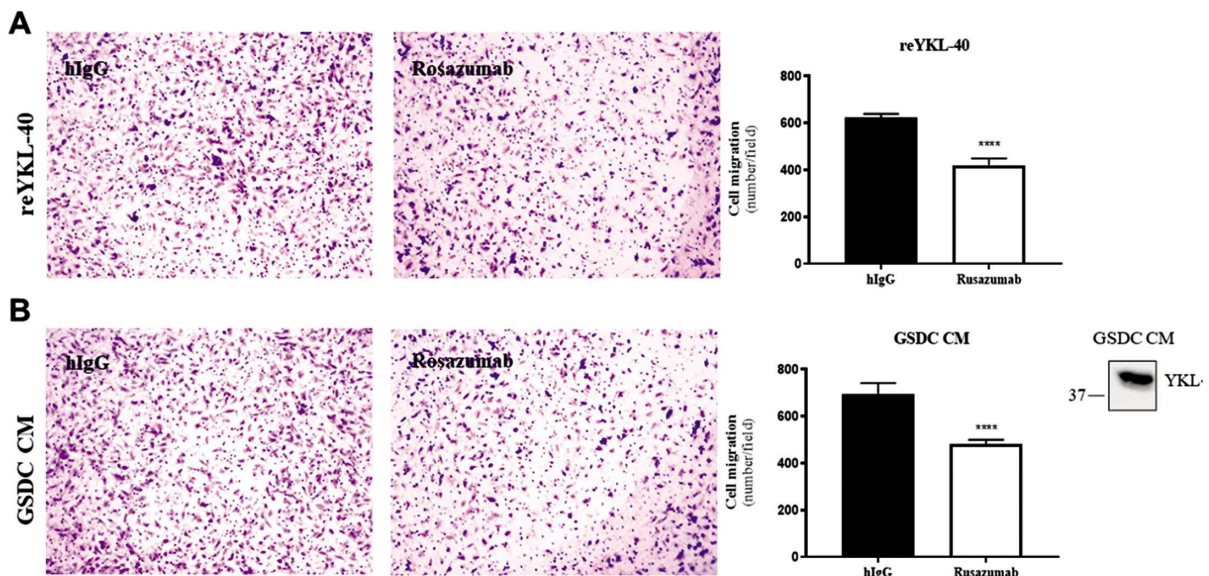


图3 对照组和 Rosazumab 处理组 HMVEC 迁移能力的比较

Fig.3 Comparison of the motile capability of HMVEC treated with Rosazumab group and control group.

A. The inhibition of Rosazumab on endothelial cell migration induced by YKL-40 recombinant protein. B. The inhibition of Rosazumab on endothelial cell migration induced by YKL-40 in GSDC conditioned medium.

Note: hIgG was compared. n=5, **** means $P < 0.0001$.

2.3 洛沙单抗抑制 HMVEC 的迁移

为了探究洛沙单抗对 HMVEC 迁移能力的影响,我们在用重组 YKL-40 蛋白刺激细胞的条件下,同时加入洛沙单抗或 hIgG(20 g/mL)。结果显示加入洛沙单抗能显著抑制 YKL-40 诱导的内皮细胞迁移(图 3A)。同样,在用 GSDCs 条件培养基(含有高表达 YKL-40)刺激的条件下,洛沙单抗能降低内皮细胞的迁移能力(图 3B),试验证明洛沙单抗能阻断肿瘤细胞分泌 YKL-40 和重组 YKL-40 蛋白的促内皮细胞迁移力。

2.4 洛沙单抗阻断 HMVEC 的微管形成

为了进一步阐明洛沙单抗是否具有抑制 YKL-40 血管再生的重要功能,我们用 Matrigel 来检测血管形成。当加入洛沙单抗后,YKL-40 诱导的 HMVEC 微管生成能力明显受阻,抑制

约 89% 的血管再生(图 4A)。类似于上面的结果,洛沙单抗能阻断 GSDC 条件培养基中 YKL-40 所产的微管形成(图 4B)。

3 讨论

本研究首次报道人源化抗 YKL-40 抗体洛沙单抗的研制工作和体外抗 YKL-40 的血管再生功能,结果显示洛沙单抗能有效抑制 YKL-40 诱导的血管再生功能,这为后续的体内动物肿瘤血管再生的阻断实验奠定了基础;同时为今后临床应用提供了重要理论依据。洛沙单抗是个嵌合抗体,其中近 80% 的 IgG 重链和轻链 CDR 区域是保留了人源 IgG 的 CDR 序列,其余 20% 是来源于鼠源 CDR,后者是真正与 YKL-40 结合的部位。洛沙单抗的异源 CDR 区域占 20%,该比例与其它目前临床使用的人源化抗体药物一致,符合嵌合抗体的基本要求。理论

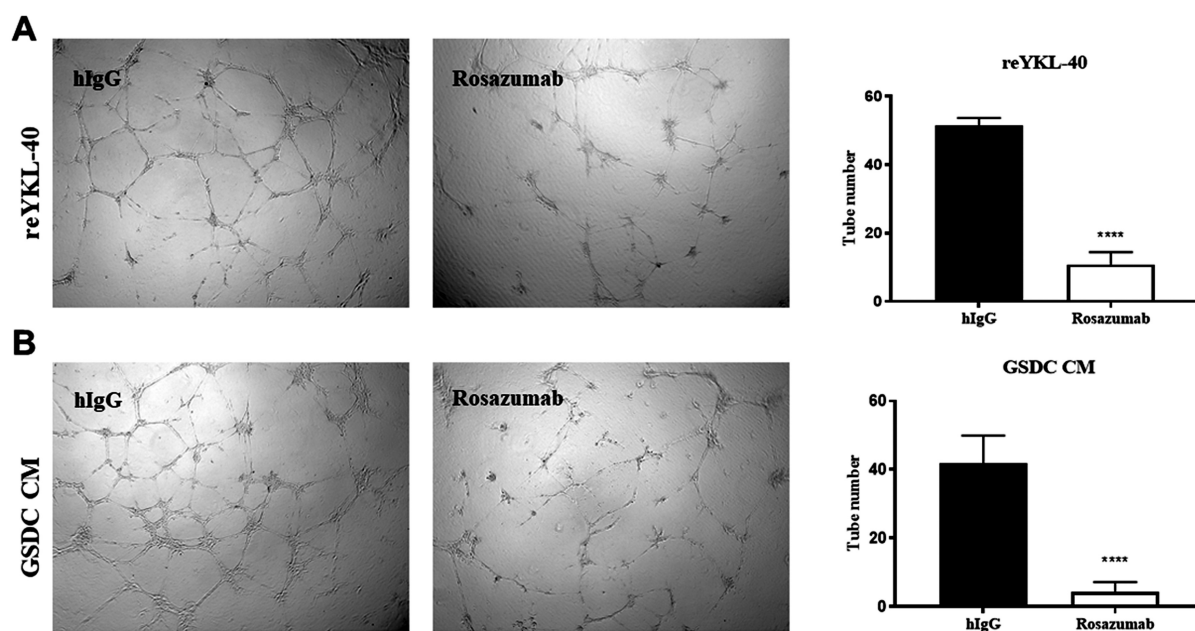


图4 对照组和 Rosazumab 处理组 HMVEC 微管形成能力的比较

Fig.4 Comparison of the tube formation ability of HMVEC treated with Rosazumab group and control group(hIgG)

A. The inhibition of Rosazumab on endothelial tube formation induced by YKL-40 recombinant protein. B. The inhibition of Rosazumab on endothelial cell migration induced by YKL-40 in GSDC conditioned medium.

Note: hIgG was compared, n=6, **** means $P<0.0001$.

上 20%的异源性 CDR 对人体产生的排异反应甚微,但考虑到安全性,我们今后仍将会进行这方面的测试。我们目前正在鉴定 YKL-40 氨基酸序列中哪个或哪些序列是真正与洛沙单抗相结合,这将有助于阐明洛沙单抗的分子作用机制。

自 90 年代初发现 YKL-40 以来,临床研究报导 YKL-40 高表达于各种癌症患者的血液和肿瘤组织^[17];但是近年来对 YKL-40 的人源化抗体的研发还从未见报道。其滞后的原因主要是缺乏其它非人类种系的中和性抗 YKL-40 抗体的前期研发。我们创建的鼠源 mAY 是首例中和 YKL-40 抗体^[10]。因此,利用这优势我们研发的洛沙单抗将是世界首例抗 YKL-40 的抗体靶向药。另外,值得我们关注的是 YKL-40 不仅是肿瘤发展的标记物,它又是其它疾病的标记物,如糖尿病、心血管疾病、肝纤维性硬化、骨关节炎、肠道炎等^[20]。因此,我们期待洛沙单抗不仅能对肿瘤患者产生有效的治疗效果,也能为其它多种疾病的患者带来佳音。

YKL-40 产生的血管作用是通过结合胞膜上的受体或蛋白而发挥作用,包括 IL-13R2a 和 syndecan-1,诱导胞内 FAK-MAPK,PI3K/AKT, -catenin/Actin 的信息传导系统^[21-23]。洛沙单抗阻断 YKL-40 是否通过胞内的一个或多个传导系统而产生效应,这还有待于进一步探讨。我们目前正在探索洛沙单抗对肿瘤细胞的阻断作用和机制,YKL-40 对不同的肿瘤细胞所产生的细胞反应和机制各不相同^[21-23],因此,阐明这些阻断机制对于澄清洛沙单抗的作用范围及临床应用将有着深远的意义。

目前我们采用 YKL-40 高表达的脑肿瘤细胞株 U87 和 GSDC 的条件培养基阐述脑肿瘤 YKL-40 的作用,今后我们将会延伸到其它一些表达 YKL-40 的肿瘤细胞系如乳腺癌 HCC1395 和胆囊癌 OCU-1,来说明该抗体作用的广泛性。在

分析洛沙单抗阻断细胞分泌 YKL-40 的作用中,我们不难发现该单抗抑制 GSDC 细胞条件培养基所诱导的内皮细胞迁移及微管形成的效应优越于重组 YKL-40 蛋白的作用(图 4),这提示源自肿瘤细胞的其他潜在血管生成因子也可能参与肿瘤血管生成,而且它们可能受 YKL-40 调控。

在当前的癌症治疗中,已有多种抗血管生成药物被 FDA 批准,如抗 VEGF 抗体贝伐单抗和 VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂(索拉非尼和舒尼替尼)等^[24,25]。但是这些抗血管生成药对多类晚期癌症的治疗效果较为短暂,机体会快速产生耐药。一旦终止治疗,肿瘤血管生成随即意外迅速发展^[26-28]。此外,最近一些研究表明,这些抗血管生成药对异种移植的肿瘤模型的血管生成和肿瘤转移起到相反的作用。例如,用抗 VEGFR2 抗体治疗肿瘤模型出乎意料地导致了肿瘤的广泛增殖和迅速扩散^[29]。使用舒尼替尼和 SU11248(VEGF 和血小板衍生的生长因子受体激酶抑制剂)反而加速局部肿瘤的侵袭和多处肿瘤转移^[30]。这些现象是否由于 YKL-40 的上调而导致肿瘤血管再生和肿瘤转移,还有待于探讨。总之,本研究在体外初步证明了一种人源化 YKL-40 中和抗体对血管生成的阻断作用,提示该抗体可以作为一种潜在的抗血管生成药,或将可以与抗 VEGF 抗体等进行联合用药。

参考文献(References)

- [1] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent[J]. Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4-6
- [2] Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets [J]. Angiogenesis, 2017, 20(4): 409-426
- [3] Youlin K, Weiyang H, Simin L, et al. Prostaglandin E2 Inhibits Prostate Cancer Progression by Countervailing Tumor Microenvironment-Induced Impairment of Dendritic Cell Migration

- through LXR α /CCR7 Pathway[J]. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2018(4): 1-8
- [4] Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE[J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(4): 789-801
- [5] Brown DM, Campochiaro PA, Bhisitkul RB, et al. Sustained benefits from ranibizumab for macular edema following branch retinal vein occlusion: 12-month outcomes of a phase III study [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(8): 1594-1602
- [6] Wu TT, Kung YH. The 12-month outcome of three consecutive monthly intravitreal injections of ranibizumab for myopic choroidal neovascularization[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2012, 28(2): 129-133
- [7] Bhargava P, Robinson MO. Development of second-generation VEGFR tyrosine kinase inhibitors: current status[J]. *Curr Oncol Rep*, 2011, 13(2): 103-111
- [8] Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(10): 2610-2621
- [9] Miyazaki S, Kikuchi H, Iino I, et al. Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(2): 295-307
- [10] Faibish M, Francescone R, Bentley B, et al. A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(5): 742-751
- [11] Shi Y, Song Y, Liu P, et al. YKL-40 can promote angiogenesis in sporadic cerebral cavernous malformation (CCM)[J]. *J Clin Neurosci*, 2019, 64(4): 220-226
- [12] Fuksiewicz M, Kotowicz B, Rutkowski A, et al. The Assessment of Clinical Usage and Prognostic Value of YKL-40 Serum Levels in Patients With Rectal Cancer Without Distant Metastasis [J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2018, 17(1): 1-8
- [13] Peng C, Peng J, Jiang L, et al. YKL-40 protein levels and clinical outcome of human endometrial cancer [J]. *Journal of International Medical Research*, 2010, 38(4): 1448-1457
- [14] Agnieszka R, Karolina J, Aleksandra P, et al. The Role of CHI3L1 Expression in Angiogenesis in Invasive Ductal Breast Carcinoma[J]. *Anticancer research*, 2018, 38(6): 3357-3366
- [15] Steponaitis G, Skiriut D, Kazlauskas A, et al. High CHI3L1 expression is associated with glioma patient survival [J]. *Diagnostic Pathology*, 2016, 11(1): 1-8
- [16] Thorn AP, Daugaard S, Christensen LH, et al. YKL-40 protein in osteosarcoma tumor tissue [J]. *Apmis Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, 2016, 124(6): 453-461
- [17] Kzhyshkowska J, Yin S, Liu T, et al. Role of chitinase-like proteins in cancer[J]. *Biol Chem*, 2016, 397(3): 231-247
- [18] Shao R, Hamel K, Petersen L, et al. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2009, 28(50): 4456-4468
- [19] Shao R, Guo X. Human microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase catalytic protein: a model for the study of in vitro angiogenesis [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2004, 321(4): 788-794
- [20] Zhao T, Su Z, Li Y, et al. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*. 2020, 5(1): 201-221
- [21] Shao R. YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis[J]. *Front Physiol*, 2013, 4(5): 122-130
- [22] Francescone RA, Scully S, Faibish M, et al. Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(17): 15332-15343
- [23] Qin S, Li A, Yi M, et al. Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 27-37
- [24] Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives[J]. *Cancer Lett*, 2012, 320(2): 130-137
- [25] Lacal PM, Graziani G. Therapeutic implication of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) targeting in cancer cells and tumor microenvironment by competitive and non-competitive inhibitors[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 136(1): 97-107
- [26] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 401-410
- [27] Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, et al. Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(11): 1810-1816
- [28] Li S, Xu HX, Wu CT, et al. Angiogenesis in pancreatic cancer: current research status and clinical implications [J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(1): 15-36
- [29] Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, et al. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(4): 299-309
- [30] Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(3): 232-239