

EGFR 单链抗体 - 力达霉素融合蛋白抑制人乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖与侵袭的研究

盛唯瑾 高瑞娟 甄永苏

摘 要 **目的** 研究 EGFR 单链抗体 - 力达霉素融合蛋白 ER(Fv - LDP - AE) 对人乳腺癌 MCF - 7 细胞增殖和侵袭的抑制作用,探讨其作用机制。**方法** 采用噻唑蓝(MTT)法测定 ER(Fv - LDP - AE)对 MCF - 7 细胞增殖的影响。流式细胞术、Hoechst 染色和 Annexin V - FITC /PI 双染法检测细胞周期的变化以及细胞凋亡。Transwell 实验测定 ER(Fv - LDP - AE)对 MCF - 7 细胞迁移和侵袭的影响。采用 RT - PCR 检测细胞 EGFR mRNA 的表达水平,Western blot 分析 ER(Fv - LDP - AE)对 EGFR 细胞信号通路的影响。明胶酶谱实验测定细胞基质金属蛋白酶(MMPs)的活性。**结果** ER(Fv - LDP - AE)能显著抑制 MCF - 7 细胞的体外增殖,其半数抑制浓度(IC₅₀)为 1.5×10^{-12} mol/L。ER(Fv - LDP - AE)可引起细胞周期 G₂/M 期阻滞,诱导细胞凋亡,抑制细胞的迁移和侵袭,阻碍 EGFR 的表达,干扰 EGFR 细胞信号通路,降低 MMPs 的活性。**结论** ER(Fv - LDP - AE)通过抑制 EGFR 及其细胞信号通路、干扰细胞周期循环和诱导细胞凋亡,抑制乳腺癌 MCF - 7 细胞的体外增殖,通过降低迁移能力和调节 MMPs 活性,阻碍肿瘤细胞的侵袭转移。

关键词 单链抗体 力达霉素 表皮生长因子受体 MCF - 7 细胞

[中图分类号] R9 [文献标识码] A

Inhibitory Efficacy of Anti - EGFR scFv - lidamycin Fusion Protein in the Proliferation and Invasion of Human Breast Cancer MCF - 7 Cells. Sheng Weijin, Gao Ruijuan, Zhen Yongsu. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract Objective To investigate the inhibitory effects of anti - EGFR scFv - lidamycin fusion protein ER(Fv - LDP - AE) in human breast cancer MCF - 7 cells proliferation and invasion, and possible mechanisms. **Methods** MTT assay was applied to measure proliferative activity of MCF - 7 cells. Flow cytometry, Hoechst fluorescent stain and Annexin V - FITC /PI were used to analyze cell cycle progression and apoptosis. Transwell assay was applied to detect the migration and invasion capacity of MCF - 7 cells. mRNA expression of EGFR was assessed by RT - PCR, and the influence of ER(Fv - LDP - AE) on EGFR signal pathway was analyzed by Western blot. The activity of MMP - 2 and MMP - 9 was detected using gelatin zymography. **Results** In vitro, the fusion protein ER(Fv - LDP - AE) showed extremely potent cytotoxicity to MCF - 7 cells with the IC₅₀ value of 1.5×10^{-12} mol/L. ER(Fv - LDP - AE) caused G₂/M arrest of cell cycle, induced apoptosis, and inhibited cell migration and invasion. Moreover, ER(Fv - LDP - AE) decreased EGFR expression, interfered with EGFR - signal pathway, and reduced the activity of MMP - 2 and MMP - 9. **Conclusion** The anti - EGFR scFv - lidamycin fusion protein ER(Fv - LDP - AE) shows potent efficacy on mammary carcinoma MCF - 7 cells including proliferative inhibition, apoptosis induction, cell cycle arrest, and blocking invasion. The mechanism of action may relate to interference with EGFR - signal pathway and MMPs activity.

Key words Single - chain Fv; Lidamycin; EGFR; MCF - 7 cells

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在包括乳腺癌、肺癌和头颈部鳞癌等多种上皮来源的人类肿瘤中都显示过度表达。EGFR

信号转导网络在肿瘤的形成和发展过程中起到重要作用,其过度表达会促进正常细胞的转化和恶性肿瘤的转移,因此 EGFR 是肿瘤治疗中一个重要的靶分子^[1-3]。力达霉素(lidamycin, LDM)是对肿瘤细胞具有强烈杀伤作用的大分子肽类抗肿瘤抗生素,是可用于构建抗体 - 药物偶联物(antibody - drug conjugates, ADCs)的“弹头”药物^[4,5]。

EGFR 单链抗体 - 力达霉素融合蛋白 ER(Fv -

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(31000416)

作者单位:100050 中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所

通讯作者:甄永苏,电子信箱:zhenys@public.bta.net.cn

LDP-AE)是运用DNA重组和分子重建两步法制备的以抗EGFR单链抗体为靶向分子,以LDM为“弹头”药物的抗体-药物偶联物,对多种过表达EGFR的肿瘤细胞的增殖抑制作用要强于LDM^[6~8]。本研究以高表达EGFR的人乳腺癌MCF-7细胞作为研究对象,对ER(Fv-LDP-AE)抑制肿瘤细胞增殖和侵袭的作用机制进行探讨,为该药物的临床转化提供实验基础。

材料与方法

1. 材料与试剂:人乳腺癌MCF-7细胞(本实验室保存);RPMI 1640培养基、胎牛血清和胰蛋白酶(美国Gibco公司);噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)和Hoechst33342(美国Sigma公司);RNaseA和Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物公司);细胞裂解液(海门碧云天生物工程研究所);BCA蛋白定量试剂盒(美国Pierce公司);Transwell小室和Matrigel(BD公司);RNAiso Plus试剂和PrimeScript[®]T-PCR Kit(日本TAKARA公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥公司);单克隆抗体(美国Epitomics公司);PVDF膜和Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(美国Millipore公司)。力达霉素LDM和EGFR单链抗体-力达霉素融合蛋白ER(Fv-LDP-AE)(本实验室制备)。其他试剂均为分析纯,水为双蒸水或RNase-free水。PCR引物EGFR-F:5'-TCCCCGTAATTATGTGCTGACAGATC-3';EGFR-R:5'-ACCCCTAAATGCCACCGGC-3';Actin-F:5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3'和Actin-R:5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'(上海英潍捷基公司合成)。

2. 细胞培养:人乳腺癌MCF-7细胞于RPMI 1640完全培养液(10%胎牛血清、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素)中,5%CO₂、37℃培养。

3. MTT法检测细胞增殖活性:取对数生长期的MCF-7细胞,用含0.25%胰酶和0.02%EDTA的消化液消化后计数,按每孔3000个细胞接种至96孔培养板中。5%CO₂、37℃培养箱中培养24h后,培养液中加入ER(Fv-LDP-AE),使药物终浓度为0.1pmol/L至100nmol/L,37℃继续培养48h。每一个药物浓度设3个平行孔,同时设立无药对照孔和无细胞空白孔。每孔加入20μl 5mg/ml MTT,37℃继续培养4h后,吸弃培养基,加入150μl DMSO,室温下摇床振荡15min。用酶标仪测定570nm的吸光度值。按照公式:抑制率(%) = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{给药组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 计算增殖抑制率。

4. 流式细胞术检测细胞周期:将MCF-7细胞接种于6孔板中,待细胞生长汇合至75%左右,更换为含ER(Fv-LDP-AE)(浓度分别为0.01和0.1nmol/L)的培养基,作用48h。胰酶消化,收集细胞,用PBS洗涤,70%冰乙醇固定30min。PBS洗细胞,每份样品加入400μl含RNaseA(100μg/ml)的PI

(25μg/ml),室温避光染色30min,流式细胞仪检测细胞周期。

5. Hoechst染色检测细胞核的变化:将对数生长期的MCF-7细胞接种于铺有无菌盖玻片的6孔板中,37℃培养24h。吸弃培养基,重新加入新鲜的培养基。加入ER(Fv-LDP-AE),并将药物浓度调整为0.1nmol/L,37℃培养4h。同时设立不加药物的对照组。弃去培养液,用PBS清洗细胞,换入新鲜的培养基,继续培养48h。用PBS清洗,加入70%乙醇固定10min。滴加DNA特异荧光染料Hoechst33342(5μg/ml),37℃避光染30min。吸弃染液,用PBS洗涤,滴加含有60%甘油的PBS封片。倒置荧光显微镜下观察并照相。

6. Annexin V-FITC/PI双染色法测定细胞凋亡:将MCF-7细胞接种于25ml细胞培养瓶,37℃培养24h。更换含有ER(Fv-LDP-AE)的新鲜培养基,37℃继续培养48h。同时设立不加药物的对照组。胰酶消化贴壁细胞并计数,调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml,1000r/min,4℃离心10min,弃去上清。用1ml预冷的PBS多次清洗细胞,将细胞重悬于200μl Binding Buffer。加入10μl Annexin V-FITC轻轻混匀,避光室温反应15min。加入300μl Binding Buffer以及5μl PI,在1h内用流式细胞仪进行检测。

7. Transwell实验检测肿瘤细胞迁移和侵袭:无血清RPMI 1640培养基孵育Transwell小室和24孔板以平衡聚酯膜。胰酶消化MCF-7细胞并计数,用含5%FBS的RPMI 1640培养基调整细胞浓度 1×10^6 个/毫升。分别将100μl细胞悬液加至上室,600μl含20%FBS的RPMI 1640培养基加至下室,同时加入终浓度为0.1nmol/L的ER(Fv-LDP-AE),37℃培养24h。同时设立不加药物的对照组。取出小室,用无水甲醇固定3min,用0.1%结晶紫染液室温染色30min。PBS清洗后,用棉签擦掉聚酯膜上层的细胞,倒置显微镜下观察细胞的迁移情况。Matrigel 4℃放置过夜使之溶解,用4℃预冷的无血清RPMI 1640培养基进行稀释。将100μl经1:5稀释的Matrigel加入到Transwell小室中,37℃温育2h,使Matrigel聚合成胶。用37℃预温的无血清RPMI 1640培养基洗涤Matrigel表面。将MCF-7细胞接种于上室,药物作用24h后取出小室,处理方法同细胞迁移实验,镜下观察细胞的侵袭情况。

8. RT-PCR检测EGFR mRNA表达水平:收集用含有ER(Fv-LDP-AE)的RPMI 1640培养基培养48h的MCF-7细胞。每 1×10^7 细胞加入1ml RNAiso Plus试剂,用移液枪反复吹吸至无明显沉淀,室温静置5min。加入1/5体积的氯仿,剧烈震荡15s,待充分乳化后,室温放置2min,4℃12000r/min离心15min。将上层无色水相移至新的离心管,加入等体积的异丙醇,混合均匀,室温放置10min。4℃12000r/min离心10min,弃去上清。加入1ml 75%乙醇,轻轻上下颠倒洗涤管壁,4℃12000r/min离心5min。弃去上清,将离心管倒置于滤纸上,空气干燥沉淀。加入100μl RNase-free去离子水,吹打至沉淀完全溶解,保存于-80℃。以1μg mRNA为模板,Random 6 mers为引物,用PrimeScript[®]T-PCR Kit反转录合成cDNA第1链。以cDNA第1链为模板,分别以EGFR-F和

EGFR-R 以及 Actin-F 和 Actin-R 引物,PCR 扩增 EGFR 和 β -actin 基因片段。PCR 条件:94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,进行 30 个循环。以 10 μ l 反应液上样,琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

9. Western blot 检测 EGFR 细胞信号通路:收集经 ER(Fv-LDP-AE)处理 48h 的 MCF-7 细胞,用 PBS 洗两遍,按每个 25ml 培养瓶加入 200 μ l 细胞裂解液的比例加入裂解液,用移液枪吹打下,使裂解液和细胞充分接触。充分裂解后,10000r/min 离心 5min,收集上清。用 BCA 蛋白定量试剂盒对样品的蛋白浓度进行定量。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,取 50 μ g 变性样品上样,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后转印至 PVDF 膜。用 1% BSA 封闭 1h,以相应的兔单克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 为二抗,用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate 进行显色,凝胶成像系统分析结果。

10. 明胶酶谱实验:将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 24 孔细胞培养板,培养 24h 后,更换为含有 ER(Fv-LDP-AE)的无血清 RPMI 1640 培养基,继续培养 24h,离心收集上清液。配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,分离胶中加入终浓度为 1mg/L 的明胶。根据细胞计数调整各组细胞培养上清液中的蛋白浓度,上样,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,将凝胶置于洗脱液(2.5% Triton X-100,50mmol/L Tris-HCl,5mmol/L CaCl₂,pH 7.6)中振荡漂洗,以去除 SDS。然后用漂洗液(除不含 Triton X-100 外其余同洗脱液)进行漂洗。将凝胶置于孵育液(50mmol/L Tris-HCl,5mmol/L CaCl₂,0.02% Brij-35,pH 7.6)中 37℃ 孵育 24h 以上。孵育结束后经染色液(0.05% 考马斯亮蓝、30% 甲醇、10% 乙酸)染色 3h,及脱色液 A、B、C(甲醇浓度分别为 30%、20% 和 10%,乙酸浓度分别为 10%、10% 和 5%)分别脱色 0.5、1 和 2h 后,显示出基质金属蛋白酶 MMP-2(72kDa)和 MMP-9(92kDa)为

位于蓝色背景上的透亮带,用凝胶成像系统分析结果。

结 果

1. ER(Fv-LDP-AE)对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制作用:MTT 法检测 ER(Fv-LDP-AE)对过表达 EGFR 的 MCF-7 细胞增殖的影响,其对 MCF-7 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为 1.5 $\times$ 10⁻¹²mol/L。药物作用 48h 后,0.001 和 0.01nmol/L ER(Fv-LDP-AE)的抑制率分别为 45.2% 和 65.1%(图 1)。

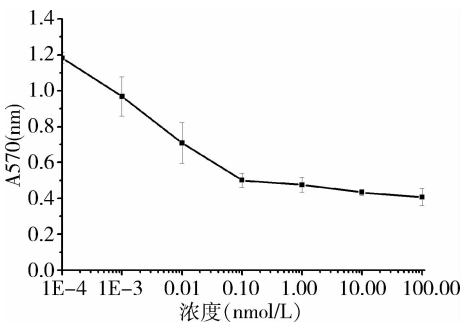


图 1 ER(Fv-LDP-AE)对 MCF-7 细胞增殖的抑制(n=3, $\bar{x}\pm s$)

2. ER(Fv-LDP-AE)对 MCF-7 细胞周期的影响:ER(Fv-LDP-AE)能够导致 MCF-7 细胞的细胞周期发生 G₂/M 期阻滞,并存在剂量依赖关系。与对照组相比,0.01nmol/L ER(Fv-LDP-AE)作用 48h 后,发生 G₂/M 期阻滞的细胞比例从 3.0% 增加到 65.3%。0.1nmol/L ER(Fv-LDP-AE)作用后 G₂/M 期阻滞的细胞比例达到 68.4%,同时伴随着 S 期细胞的增加以及 G₁ 期细胞的进一步减少(图 2)。

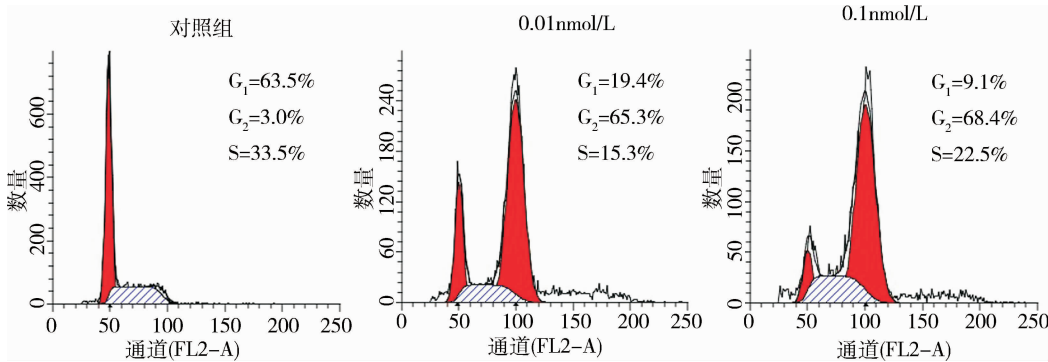


图 2 ER(Fv-LDP-AE)对 MCF-7 细胞周期的影响

3. ER(Fv-LDP-AE)诱导 MCF-7 细胞凋亡:
(1) Hoechst33342 染色观察细胞凋亡:用 DNA 特异荧光染料 Hoechst33342 进行染色,荧光显微镜下(图 3)观察到,与对照组细胞相比,经 ER(Fv-LDP-AE)

处理的 MCF-7 细胞出现典型的细胞凋亡现象:细胞核增大,部分细胞染色质凝集,分裂不均,形成多个微核,说明 ER(Fv-LDP-AE)能够诱导细胞发生凋亡。(2) Annexin V-EGFP/PI 双染检测细胞凋亡:

运用 Annexin V - EGFP/PI 双染试剂结合流式细胞仪检测 ER(Fv - LDP - AE)对 MCF - 7 细胞凋亡的影响。药物作用 48h,能够诱导细胞发生早期凋亡、晚期凋亡甚至坏死,诱导程度与药物剂量存在依赖关系。0.01nmol/L ER(Fv - LDP - AE)诱导 6.4% 细胞发生早期凋亡,9.3% 发生晚期凋亡和坏死。0.1nmol/L ER(Fv - LDP - AE)诱导 7.1% 细胞发生早期凋亡,23.1% 细胞发生晚期凋亡和坏死(图 4)。

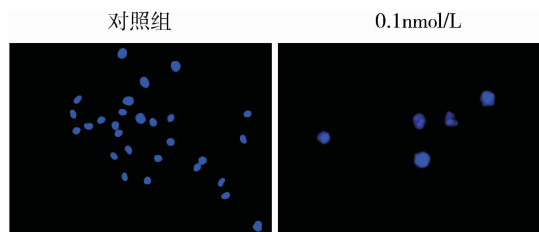


图 3 ER(Fv - LDP - AE) 诱导 MCF - 7 细胞凋亡
荧光染色, $\times 200$

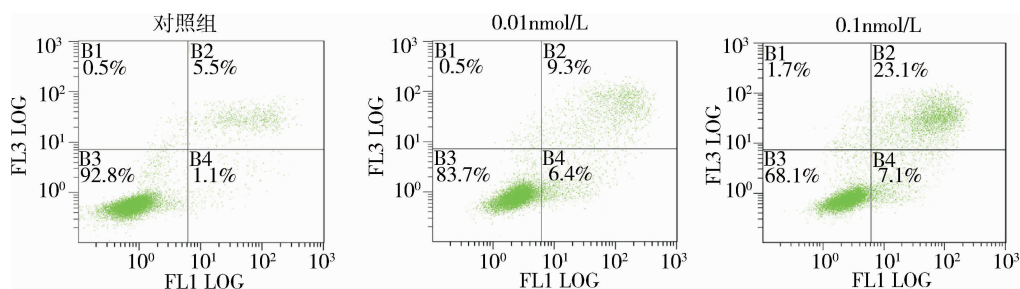


图 4 ER(Fv - LDP - AE) 对 MCF - 7 细胞凋亡的影响

4. ER(Fv - LDP - AE)抑制 MCF - 7 细胞迁移和侵袭:Transwell 法检测 ER(Fv - LDP - AE)对 MCF - 7 细胞迁移、侵袭能力的影响。与对照组细胞相比,经 0.1nmol/L ER(Fv - LDP - AE)处理 24h 后的 MCF - 7 细胞的迁移受到抑制,从聚酯膜上层迁移至下层的细胞数显著减少(图 5)。同样的,经 ER(Fv - LDP - AE)作用后,MCF - 7 细胞的侵袭能力也受到影响,穿过 Matrigel 到达聚酯膜下层的细胞数也明显减少,说明该药物对肿瘤细胞的迁移和侵袭能力有抑制作用(图 6)。

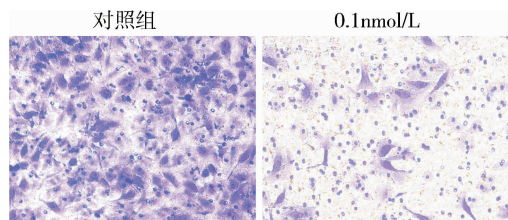


图 5 ER(Fv - LDP - AE) 抑制 MCF - 7 细胞迁移
结晶紫染色, $\times 200$

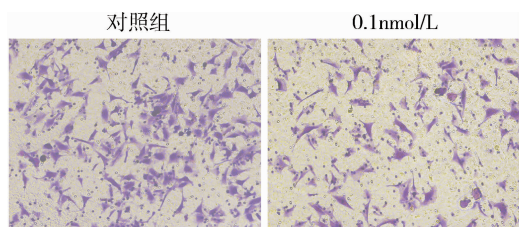


图 6 ER(Fv - LDP - AE) 抑制 MCF - 7 细胞侵袭
结晶紫染色, $\times 200$

5. ER(Fv - LDP - AE)抑制 EGFR mRNA 表达水平:提取 MCF - 7 细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,以 EGFR - F 和 EGFR - R 为引物,PCR 扩增 EGFR 基因片段。琼脂糖电泳检测显示 EGFR 基因片段长 250bp,相比于对照组,给药组基因片段所释放出来的荧光强度较弱,说明 EGFR mRNA 的表达受到抑制。相反的,作为内参的 β - actin 基因片段的荧光强度给药组与对照组比较无显著差异(图 7)。

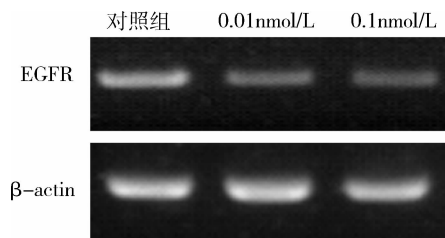


图 7 RT - PCR 检测 mRNA 表达水平

6. ER(Fv - LDP - AE)对 EGFR 细胞信号通路的影响:用细胞裂解液裂解 MCF - 7 细胞,提取全细胞蛋白进行 SDS - PAGE 电泳,转印至 PVDF 膜。以兔单克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 为二抗,底物显色,凝胶成像系统分析 EGFR 细胞信号通路信号分子的表达以及磷酸化情况。如图 8 所示,ER(Fv - LDP - AE)能够抑制 EGFR、Ras 和 ERK_{1/2} 的表达以及 EGFR、Akt 和 ERK_{1/2} 的磷酸化,干扰 EGFR 信号通路。

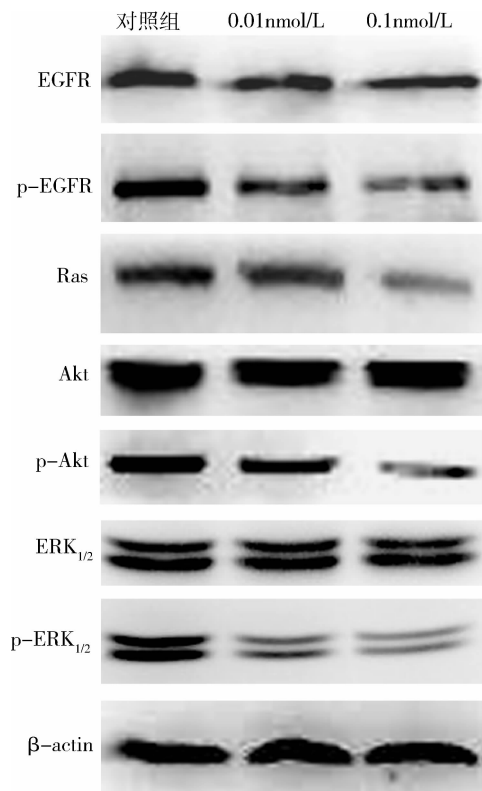


图 8 ER(Fv-LDP-AE)对 EGFR 细胞信号通路的影响

7. ER(Fv-LDP-AE)抑制基质金属蛋白酶活性:基质金属蛋白酶(MMP-2 和 MMP-9)在肿瘤细胞侵袭转移的过程中发挥着重要作用。明胶酶谱实验结果显示,经 ER(Fv-LDP-AE)作用 24h 的 MCF-7 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 活性受到部分抑制,其降解胞外基质的能力下降,这与 Transwell 实验中 ER(Fv-LDP-AE)抑制 MCF-7 细胞侵袭能力的结果相一致(图 9)。

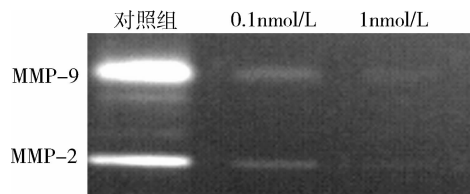


图 9 ER(Fv-LDP-AE)抑制基质金属蛋白酶活性

讨 论

EGFR 是一种分布于组织细胞膜上的多功能糖蛋白,属于酪氨酸激酶,是肿瘤靶向治疗中一个公认的靶点。以 EGFR 为靶点的抗肿瘤药物对包括乳腺癌在内的多种肿瘤都具有较好的疗效^[9-11]。ER(Fv-LDP-AE)是以 EGFR 单链抗体为靶向分子,LDM 为“弹头”药物的特异性融合蛋白,能够有效提高

LDM 对过表达 EGFR 的肿瘤细胞的增殖抑制作用。本文选用高表达 EGFR 的人乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象,探讨 ER(Fv-LDP-AE)对肿瘤细胞增殖和侵袭能力的影响及其作用机制。

MTT 结果显示,ER(Fv-LDP-AE)对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖有强烈的抑制作用,并呈现剂量-效应依赖关系。流式细胞术检测显示,0.1nmol/L ER(Fv-LDP-AE)作用 48h,可将 68.4% 细胞阻滞于 G₂/M 期,引起 23.1% 细胞发生晚期凋亡。EGFR 及其配体是细胞信号转导系统的一部分,其信号转导网络的活化触发一系列的生理反应,包括增殖、细胞分裂、生存和死亡、运动、侵袭、黏附和细胞修复等^[12,13]。RT-PCR 和 Western blot 实验结果表明,0.1nmol/L ER(Fv-LDP-AE)能够减少 EGFR mRNA 以及 EGFR 蛋白的表达,同时阻碍细胞信号通路中 Ras 和 ERK_{1/2} 蛋白的表达以及 EGFR、Akt 和 ERK_{1/2} 的磷酸化,诱导细胞发生 G₂/M 期阻滞和凋亡,从而抑制 MCF-7 细胞的增殖^[14]。据相关文献报道,LDM 本身亦可通过线粒体依赖通路介导细胞凋亡,因此 ER(Fv-LDP-AE)可通过干扰 EGFR 信号通路强化 LDM 对细胞的凋亡诱导作用^[15]。

肿瘤细胞的侵袭转移是一个复杂的过程,受到多种因素的调控,是肿瘤细胞与其微环境相互作用的结果。Transwell 细胞侵袭实验显示,经 0.1nmol/L ER(Fv-LDP-AE)处理 24h 后,细胞穿越 Matrigel 到达聚酯膜下层的细胞数明显减少,说明 ER(Fv-LDP-AE)抑制了 MCF-7 细胞的侵袭能力。未铺 Matrigel 的迁移实验中,药物处理后细胞从聚酯膜上层运动至下层的细胞数也明显减少,说明该药物对肿瘤细胞自身的迁移能力也有影响。同时在明胶酶谱中也观察到 MCF-7 细胞基质金属蛋白酶活性的下降。以上一系列的实验结果表明,ER(Fv-LDP-AE)抑制肿瘤细胞侵袭转移的作用机制包括直接抑制细胞本身的运动能力,抑制基质金属蛋白酶活性,减少其对胞外基质的降解作用。

本研究对融合蛋白 ER(Fv-LDP-AE)抑制肿瘤生长的作用机制进行了探讨,通过干扰信号转导、阻碍细胞周期进程和诱导凋亡有效抑制肿瘤细胞的体外增殖;通过降低细胞本身迁移能力以及基质金属蛋白酶活性抑制肿瘤细胞的侵袭转移,为 ER(Fv-LDP-AE)的临床转化提供了实验依据。

参考文献

- 1 Ciardiello F, Tortora G. A Novel approach in the treatment of cancer:

- targeting the epidermal growth factor receptor [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5): 2958 – 2970
- 2 Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment [J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1160 – 1174
- 3 Ellis LM, Hoff PM. Targeting the epidermal growth factor receptor; an important incremental step in the battle against colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(7): 1177 – 1179
- 4 甄永苏, 薛玉川, 邵荣光. 烯二炔类新抗生素 C1027 的抗肿瘤作用研究[J]. 中国抗生素杂志, 1994, 19(2): 164 – 168
- 5 马迪, 洪斌. 新型烯二炔类抗肿瘤抗生素力达霉素的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(1): 11 – 16
- 6 盛唯瑾, 苗庆芳, 甄永苏. 抗表皮生长因子受体噬菌体抗体库的构建筛选及单链抗体可溶性表达[J]. 药学报, 2009, 44(6): 597 – 6024
- 7 盛唯瑾, 尚伯杨, 苗庆芳, 等. 抗表皮生长因子受体的单链抗体 ER(Fv)的构建及其抗肿瘤活性[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(18): 481 – 486
- 8 Sheng WJ, Shang Y, Miao QF, *et al.* Antitumor efficacy of the scFv – based fusion protein and its enediyne – energized analogue that are directed against epidermal growth factor receptor [J]. Anticancer Drugs, 2012, 23(4): 404 – 416
- 9 Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, *et al.* EGFR inhibition with cetux-
imab added to carboplatin in metastatic triple – negative breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(15S): 1009 – 1019
- 10 Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, *et al.* Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX – 4 as first – line treatment for metastatic colorectal cancer; the OPUS study [J]. Ann Oncol, 2011, 22(7): 1535 – 1546
- 11 Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, *et al.* Gefitinib or chemotherapy for non – small – cell lung cancer with mutated EGFR [J]. N Engl Med, 2010, 362(25): 2380 – 2388
- 12 Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer [J]. FEBS J, 2010, 277(2): 301 – 308
- 13 Whittaker S, Marais R, Zhu ADX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2010, 29(36): 4989 – 5005
- 14 黄健清, 梁红玲, 张绪超. 肺癌中凋亡信号途径及其与 EGFR 通路的关系[J]. 广东医学, 2012, 33(7): 1015 – 1017
- 15 邱强, 王真, 蒋建明, 等. 力达霉素经线粒体依赖途径接到细胞凋亡[J]. 药学报, 2007, 42(2): 132 – 138

(收稿日期:2013 – 12 – 24)

(修回日期:2014 – 01 – 06)

磷酸化 AKT 和 HER – 2 蛋白在早发性乳腺癌中的表达及意义

顾 蕾 陈一飞 应明真 王雅杰

摘 要 目的 探讨 pAKT 和 HER – 2 蛋白在女性早发性乳腺癌组织中的表达及其临床意义。方法 采用免疫组化 SP 法检测 66 例病理资料完整的女性早发性乳腺癌标本中 pAKT 和 HER – 2 的表达状态,并分析其与肿瘤大小、淋巴结转移及 ER、PR 等的关系。**结果** 66 例乳腺癌组织中的 pAKT 表达阳性率为 46.97% (31/66), HER – 2 表达阳性率为 31.82% (21/66), pAKT 的表达水平在 ER 阳性和 ER 阴性组间差异具有统计学意义 ($P=0.030$), 与肿瘤大小 ($P=0.769$)、淋巴结转移 ($P=0.322$)、临床分期 ($P=0.359$)、病理类型 ($P=0.569$)、组织学分级 ($P=0.778$)、PR 表达 ($P=0.309$) 均无关; HER – 2 表达水平在淋巴结转移和未转移组间的差异有统计学意义 ($P=0.012$), 而与肿瘤大小 ($P=0.995$)、临床分期 ($P=0.661$)、病理类型 ($P=0.846$)、组织学分级 ($P=0.763$)、ER 表达 ($P=0.610$)、PR 表达 ($P=0.860$) 均无关; pAKT 与 HER – 2 表达呈正相关 ($r=0.270, P=0.029$)。**结论** 在早发性乳腺癌中, pAKT 及 HER – 2 过表达与患者后续激素治疗的反应性及早期复发、淋巴结转移等恶性生物学行为密切相关。同时,联合应用芳香化酶抑制剂和 AKT 信号通路抑制剂可能会更好的控制早发性乳腺癌的发生和发展。

关键词 乳腺肿瘤 磷酸化蛋白激酶 B 人表皮生长因子受体 2 免疫组织化学

[中图分类号] R73 [文献标识码] A

Expression and Clinical Significance of pAKT and HER – 2 Protein in Early – onset Breast Cancers. Gu Lei, Chen Yifei, Ying Mingzhen,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072175, 81102010, 81372854);上海市科委基础研究重点项目(13NM1401504);上海市重点学科建设项目(B905);第二军医大学附属长海医院 1255 学科建设计划特色培育项目(CH125530400)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:wangyajie168@gmail.com