

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.013

靶向 HER2/EGFR 分子双特异性单链抗体的构建及其体内抗乳腺癌的研究

郭 艳, 张长庆[△]

(内蒙古医科大学附属医院乳腺肿瘤科, 呼和浩特 010020)

摘 要:目的 构建一种可以同时靶向抑制人类表皮生长因子受体 2(HER2)和表皮生长因子受体(EGFR)分子的双特异性单链抗体,从而降低单一通路抑制而造成的耐药性,增强抗肿瘤效果。**方法** 采用 Overlap PCR 法通过柔性肽(G4S)将曲妥珠单抗的可变区与西妥昔单抗连接,构建工程载体,并通过大肠埃希菌系统进行表达纯化,获得同时靶向 HER2 和 EGFR 的双特异性单链抗体;流式细胞术检测双特异性单链抗体对 EGFR 和 HER2 过表达的乳腺癌细胞 BT474 的结合能力;噻唑蓝(MTT)法检测单链抗体对 BT474 乳腺癌细胞的增殖抑制;建立 BT474 荷瘤小鼠动物模型,检测双特异性单链抗体的体内抗肿瘤活性;使用免疫组织化学检测单链抗体是否可以抑制表皮生长因子受体(EGFR)的磷酸化,并对肿瘤细胞增殖指标 Ki-67 进行检测。**结果** 通过基因工程手段和毕赤酵母表达及镍柱纯化,成功获得双特异性单链抗体,经蛋白印迹法鉴定验证了双特异性单链抗体表达及装配正确。流式细胞术检测双特异性单链抗体与乳腺癌细胞 BT474 的结合率为 53.3%,与曲妥珠单抗(69.0%)、西妥昔单抗结合率(60.3%)相当。MTT 法中,与磷酸盐缓冲液(PBS)组相比,曲妥珠单抗组、西妥昔单抗组与双特异性单链抗体组对乳腺癌细胞 BT474 均有抑制作用,且抑制作用呈浓度依赖性。在蛋白水平为 400 nmol/L 时,双特异性单链抗体组抑制率[(65.19±4.21)%]强于曲妥珠单抗组[(40.67±1.78)%]与西妥昔单抗组[(32.20±2.94)%]。通过裸鼠移植瘤模型的体内抗肿瘤实验,双特异性单链抗体组在体内仍能发挥较强的抗肿瘤效果,高剂量组肿瘤抑制率可以达到(74.32±4.37)%,明显优于曲妥珠单抗组(44.83±6.02)%与西妥昔单抗组(39.44±8.75)%。通过免疫组织化学对给药后的肿瘤组织进行分析,与 PBS 组相比,双特异性单链抗体组可以明显抑制 BT474 皮下移植瘤组织中 p-EGFR、Ki-67 的表达量。**结论** 采用毕赤酵母表达体系成功构建并表达了双特异性单链抗体。双特异性单链抗体具有良好的体内外抗肿瘤活性,有效抑制乳腺癌细胞 BT474 的体内外增殖,并通过免疫组织化学分析到双特异性单链抗体可以抑制 EGFR 的磷酸化并抑制肿瘤细胞的增殖,为抗肿瘤治疗提供了新的思路,有潜在的临床应用前景。

关键词:人类表皮生长因子受体 2; 表皮生长因子受体; 乳腺癌; 双特异性单链抗体

中图分类号:R737.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2887-05

Study on construction of targeted HER2/EGFR bispecific single-chain antibody and its anti-breast carcinoma in vitro and vivo

GUO Yan, ZHANG Changqing[△]

(Department of Breast Oncology, Affiliated People's Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010020, China)

Abstract: **Objective** To construct a bispecific single-chain antibody with targeted inhibition on HER2/EGFR, thus to reduce the drug resistance caused by single channel inhibition and enhance the anti-tumor effect. **Methods** The overlap PCR was used to link the variable region of trastuzumab and cetuximab by flexible peptide (G4S) for constructing the engineering vector. Then the expression purification was performed by Escherichia coli system for obtaining simultaneously targeted HER2 and EGFR bispecific single-chain antibody. The binding activity of bispecific single-chain antibody to HER2 and EGFR overexpression breast carcinoma cell line BT474 was detected by flow cytometry. The methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay was used to detect the inhibition of single-chain antibody to the proliferation of breast carcinoma BT474 cells. Finally, the tumor-bearing mouse animal model of BT474 cells was established. Then the in vivo anti-tumor activity of bispecific monoclonal antibody was detected; the immunohistochemical method was used to detect whether the monoclonal antibody can inhibit the phosphorylation of dermal growth factor receptor (EGFR) and tumor cellular proliferative activity index Ki-67 was detected. **Results** The bispecific single-chain antibody was successfully obtained by using the genetic engineering technique, pichia pastoris expression and Ni-sepharose purification.

tion. The western blot identification verified the correct expression and assembling of bispecific single-chain antibody. The binding rate of bispecific single-chain antibody to BT474 cells was 53.3% by flow cytometry, which was similar to trastuzumab (69.0%) and cetuximab (60.3%). In the MTT assay, compared with phosphade butter solution (PBS) group, trastuzumab group, cetuximab group and bispecific single-chain antibody group all had the inhibiting effect on breast carcinoma BT474 cells, moreover their inhibiting effect showed the concentration dependence. And when the protein level was 400 nmol/L, the inhibitory rate of bispecific single-chain antibody was $(65.19 \pm 4.21)\%$, which was stronger than $(40.67 \pm 1.78)\%$ in trastuzumab group and $(32.20 \pm 2.94)\%$ in cetuximab group. In the in vivo anti-tumor detection of nude mouse xenografts model, the bispecific single-chain antibody group still played a stronger antitumor effect in vivo, and the tumor inhibitory rate of high dose group could reach to $(74.32 \pm 4.37)\%$, which was significantly better than trastuzumab group $(44.83 \pm 6.02)\%$ and cetuximab group $(39.44 \pm 8.75)\%$. In analyzing the tumor tissues after giving medication by immunohistochemistry, compared with the PBS group, the bispecific single-chain antibody group could significantly inhibit the phosphorylation of EGFR (pEGFR) in BT474 subcutaneous xenografts tumor tissues and Ki-67 expression level. **Conclusion** The bispecific singlechain antibody is successfully constructed by using the pichia pastoris expression system, which has better in vivo and in vitro anti-tumor activity, effectively inhibits the in vivo and in vitro proliferation of breast carcinoma BT474 cells, can inhibit the EGFR phosphorylation analyzed by immunohistochemistry, provides a new idea for anti-tumor treatment and has potentially clinical application prospect.

Key words: human epidermal growth factor receptor type 2; epidermal growth factor receptor; breast carcinoma; bispecific singlechain antibody

据统计,全球因乳腺癌死亡的人数达到每年 46 万^[1]。乳腺癌成为严重危及女性健康甚至生命的恶性肿瘤。如今对于乳腺癌的治疗仍以手术切除和化疗、放疗、内分泌治疗的联合治疗为主^[2-3],但不良反应多、患者依从性差、复发率高等问题仍然没有得到很好解决。而近些年分子靶向药物的发展明显改善了乳腺癌的治疗效果,单克隆抗体药物作为最为主要的靶向药物,其通过与受体的结合激活下游信号通路或者下调受体表达,达到促肿瘤细胞凋亡或抑制的作用^[4-6]。其中最为有效的抗体治疗药物为靶向人类表皮生长因子受体 2(HER2)的曲妥珠单抗和靶向表皮生长因子受体(EGFR)的西妥昔单抗^[7-8]。HER2 与 EGFR 都属于酪氨酸激酶 EGFR 家族,在多种乳腺癌的发生、发展过程中过度表达或激活。针对 HER2 与 EGFR 靶点的单克隆抗体可以很好地阻断肿瘤细胞的信号传导,抑制酪氨酸激酶的活性,从而抑制肿瘤的发生、发展^[9]。

研究发现,当长期使用单一靶向 HER2 或 EGFR 的药物抑制某一通路时,在给药一段时间后会造成肿瘤细胞的代偿,产生耐药性,致使药效明显降低。而同时靶向 HER2 和 EGFR 两个靶点则可以抑制多条细胞信号传导通路,避免单一抑制的代偿,降低耐药性和不良反应^[9]。基于这一理论,本文提出一种同时靶向 HER2 和 EGFR 双特异性单链抗体的研究方案。其相较于单克隆抗体含有两种特异性抗原结合位点,在肿瘤细胞的不同靶点之间同时发挥效应功能,产生协同抑制的效果,解决了抗体单独使用疗效不佳且易产生耐药性的问题^[10-13]。并且双特异性单

链抗体相对于双特异性抗体相对分子质量更小,肿瘤组织渗透能力更强,免疫原性更低,为肿瘤的临床治疗提供新的方案和思路^[14-15]。

1 材料与方法

1.1 材料来源 DMEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司;蛋白标志物购自美国热电公司;鼠抗 His 抗体、FITC 偶联的羊抗鼠 IgG-Fc 单克隆抗体购自南京赛博生物公司;西妥昔单抗购自德国默克公司;曲妥珠单抗购自瑞士罗氏公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Invitrogen 公司;Balb/c 裸鼠购自扬州大学动物中心;免疫组织化学试剂盒 DAB 显色剂购自 DAKE 公司;细胞培养瓶及相关培养耗材购自美国热电公司。

1.2 方法

1.2.1 双特异性单链抗体表达及纯化 通过 Drug-Bank 数据库搜索曲妥珠单抗和西妥昔单抗的轻链与重链可变区蛋白序列,使用柔性肽(G4S)将其连接在一起,并在 C 端引入 6 个组氨酸作为 His 标签。双特异性单链抗体序列经过毕赤酵母偏爱密码子优化后送公司合成,并导入工程质粒中。采用毕赤酵母 X-33 表达系统进行检测。发酵液经硫酸铵沉淀法初步提取后采用镍柱进一步分离纯化得到电泳纯蛋白,最后利用蛋白印迹法(western blot)对纯化得到的蛋白进行鉴定,以期获得高产量、高纯度的双特异性单链抗体^[16]。

1.2.2 流式细胞术 制备乳腺癌 BT474 单细胞悬液,细胞密度为每毫升 10^7 个。分为曲妥珠单抗组、西妥昔单抗组,双特异性单链抗体组和脱脂牛奶空白对照组。在每组中分别加入 250 μ L 相应的抗体或脱

脂牛奶,抗体水平为 100 nmol/mL,冰上孵育 1 h,洗涤,孵育鼠抗 His 抗体,洗涤,再孵育 FITC-偶联的羊抗鼠 IgG 抗体,洗涤,上机检测。使用 FlowJo 7. 6. 1 对流式数据进行处理。

1. 2. 3 细胞增殖抑制实验(MTT 法) 制备 BT474 单细胞悬液,铺板,用培养基将细胞水平调整至每毫升 3×10^4 个,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔细胞培养板,设置只有培养基不含细胞的空白对照组。用含 2% FBS 的相应培养基将曲妥珠单抗、西妥昔单抗以及等量双特异性单链抗体以每孔 50 μ L 的量加入 96 孔板中,每个水平设置 3 个复孔,37 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养 1 h。按照每孔 50 μ L 的量加入含 20 ng/mL 表皮生长因子(EGF)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的 2% FBS-1640 培养基,使每孔中 EGF 和 VEGF 的终浓度均为 10 ng/mL;培养 72 h 后每孔加入 11 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL),37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μ L DMSO 后将 96 孔板放于微量振荡器上振荡 1 min。最后用酶标仪检测 57 nm 处和 63 nm 处的吸光度,将 $A_{570} \sim A_{630}$ 作为每个孔的吸光度。抑制率按此计算公式:抑制率=(对照组吸光度-实验组吸光度)/对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1. 2. 4 体内抗肿瘤活性检测 制备 BT474 单细胞悬液,细胞数在每毫升 10^6 个,取 200 μ L 细胞悬液接种于裸鼠右侧腋皮下,观察移植瘤生长情况。并随机分组,每组 8 只,共分为以下 5 组:阴性对照组[磷酸盐缓冲液(PBS)组]、抗 HER2 的曲妥珠单抗组(10 mg/kg)、抗 EGFR 的西妥昔单抗组(10 mg/kg)、同时靶向 HER2 与 EGFR 的双特异性单链抗体高剂量组(10 mg/kg)、双特异性单链抗体低剂量组(5 mg/kg)。待瘤体积达到 50~100 mm³ 时开始尾静脉给药(记为 day1),每两天给一次药并且对肿瘤体积进行测量,按以下公式计算肿瘤体积: $V=L \times W^2/2$ (其中 V 代表肿瘤体积,L 代表肿瘤最长径,W 代表肿瘤垂直方向的最大横径),绘制肿瘤生长曲线。在第 19 天结束给药,并计算各组体内肿瘤抑瘤率,抑瘤率=(对照组平均体积-实验组平均体积)/对照组平均体积 $\times 100\%$ 。

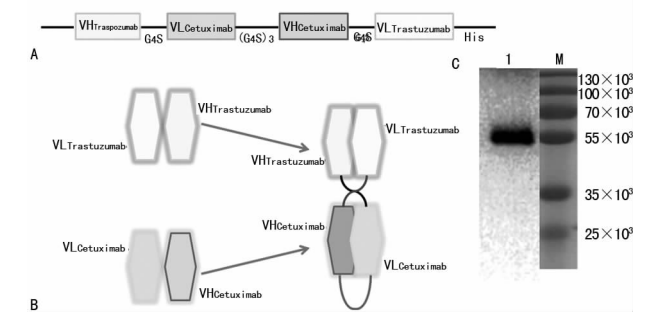
1. 2. 5 免疫组织化学检测瘤内指标 将肿瘤切取合适大小的组织块用于固定,组织块用 PBS 洗涤两遍,迅速浸入 4% 多聚甲醛固定液中固定 24 h。之后浸入 70% 乙醇 30 min(重复 3 次),80% 乙醇 30 min(重复 2 次),85% 乙醇 30 min,90% 乙醇 30 min,95% 乙醇 30 min,100% 乙醇 30 min(重复 2 次)。乙醇:二甲苯(1:1) 30 min,二甲苯 10 min,二甲苯:石蜡(1:1) 30 min,石蜡 2 h。将浸好蜡的肿瘤组织于包埋机内进行包埋。将蜡块置于切片机上进行切片,片厚 4 μ m。切片漂浮于摊片机上,40 $^{\circ}$ C 温水上将组织展平,用载玻片将组织捞起,放进 60 $^{\circ}$ C 烘箱内烤片。切片脱蜡后将修复盒盛满 EDTA 抗原修复缓冲液

(pH9.0),然后将组织切片置于其中并放入微波炉内加热,进行抗原修复,自然冷却后将玻片置于 PBS,摇洗 3 次。3% H₂O₂ 溶液室温避光孵育 20 min,PBS 中洗涤 3 次。5%~10% 的山羊血清室温孵育 10 min 以封闭切片,去封闭液后,滴加适量 5% BSA 稀释好的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,将组织切片稍甩干后,滴加适当比例稀释的 HRP 偶联的二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,PBS 洗 3 遍。DAB 试剂盒显色。用梯度乙醇将切片脱水干燥,吹风机吹干玻片后二甲苯透明,中性树胶封片,最后拍照。

1. 3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验,组间两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2. 1 获取双特异性单链抗体 搜索曲妥珠单抗和西妥昔单抗的轻链与重链可变区蛋白序列,通过 Overlap PCR 技术将其通过 G4S 连接在一起,并在 C 端引入 6 个组氨酸作为 His 标签(图 1A),导入工程质粒中,毕赤酵母 X-33 进行表达。经过硫酸铵沉淀法和镍柱纯化得到双特异性单链抗体。在双特异性单链抗体的示意图(图 1B)可以看出,其具有同时靶向 HER2 和 EGFR 的双特异性。双特异性单链抗体的相对分子质量为 55×10^3 ,western blot 验证了双特异性单链抗体装配的正确性(图 1C)。研究获得了纯度较高且装配正确的双特异性单链抗体。



注:A 为双特异性单链抗体基因设计;B 为双特异性单链抗体结构示意图;C 为 western blot 验证抗体相对分子质量;VHTrastuzumab 为曲妥珠单抗重链可变区;VLcetuximab 为西妥昔单抗轻链可变区;VHcetuximab 为西妥昔单抗重链可变区;VLTrastuzumab 为曲妥珠单抗轻链可变区;1 为纯化的双特异性单链抗体;M 为蛋白标记物

图 1 双特异性单链抗体的基因设计、结构示意图及 western blot 验证

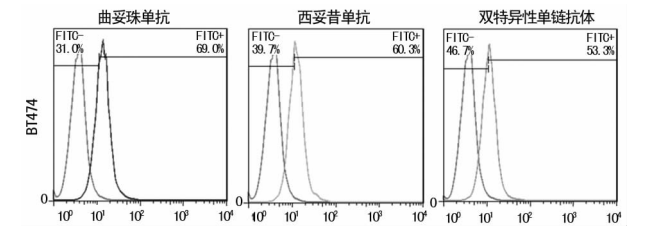
2. 2 流式细胞术结合实验结果 双特异性单链抗体能有效结合到乳腺癌 BT474 细胞表面。结果显示,曲妥珠单抗与 BT474 细胞的结合率为 69.0%,西妥昔单抗为 60.3%,双特异性单链抗体为 53.3%,表明制备的双特异性单链抗体仍然保留母体抗体的结合活性,并没有因为抗体改造造成结合能力的降低。同时也从另一个方面说明乳腺癌 BT474 细胞株是 HER2 阳性,同时也是 EGFR 阳性的细胞株,证明了模型选

择的正确性。见图 2。

2.3 MTT 法分析双特异性单链抗体对乳腺癌 BT474 细胞增殖的抑制作用 实验结果表明,与 PBS 组相比,曲妥珠单抗组、西妥昔单抗组与双特异性单链抗体组(包括高剂量组和低剂量组)对 BT474 细胞均有抑制效果,且抑制作用呈浓度依赖性。在抗体水平达到 400 nmol/L 时,双特异性单链抗体高剂量组抑制增殖率可以达到(65.19±4.21)%,明显强于曲妥珠单抗组[(40.67±1.78)%]和西妥昔单抗组[(32.20±2.94)%]。通过 MTT 法可以进一步确定双特异性单链抗体设计的优势与效果。见表 1。

2.4 体内抗肿瘤实验检测结果 在体外细胞活性实验中,双特异性单链抗体展现出良好的抗肿瘤活性,其抑制 BT474 肿瘤细胞增殖的能力强于曲妥珠单抗和西妥昔单抗。进一步研究了其体内抗肿瘤活性,实验结果表明,单独抑制 HER2 或 EGFR 均能有效抑制肿瘤的生长,同时抑制 HER2 和 EGFR 的作用效果更加明显。双特异性单链抗体能显著抑制 BT474 细胞裸鼠移植瘤的生长,其抗肿瘤作用效果呈现浓度

依赖性,高浓度抗体给药组的活性比低浓度给药组强。在第 19 天给药结束,通过肿瘤体积的测量发现,双特异性单链抗体高剂量组在体内发挥较强的抗肿瘤效果,该给药组的肿瘤体积明显低于其他各组(图 3)。与 PBS 组相比,双特异性单链抗体高剂量组肿瘤抑制率可以达到(74.32±4.37)%,明显优于双特异性单链抗体低剂量组[(57.76±3.98)%]、曲妥珠单抗组[(44.83±6.02)%]、西妥昔单抗组[(39.44±8.75)%],差异均有统计学意义($P<0.05$)。



注:A 为曲妥珠单抗与 BT474 细胞的结合;B 为西妥昔单抗与 BT474 细胞的结合;C 为双特异性单链抗体与 BT474 细胞的结合

图 2 曲妥珠单抗、西妥昔单抗、双特异性单链抗体与 BT474 细胞的结合

表 1 MTT 法检测各组细胞抑制率($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	100 nmol/L	200 nmol/L	400 nmol/L
曲妥珠单抗组	8	29.03±0.92 *	31.83±1.32 *	40.67±1.78 *
西妥昔单抗组	8	25.50±0.83 *	27.42±2.07 *	32.20±2.94 *
双特异性单链抗体高剂量组	8	38.18±3.01	47.36±2.96	65.19±4.21

注:与双特异性单链抗体高剂量组比较,* $P<0.05$

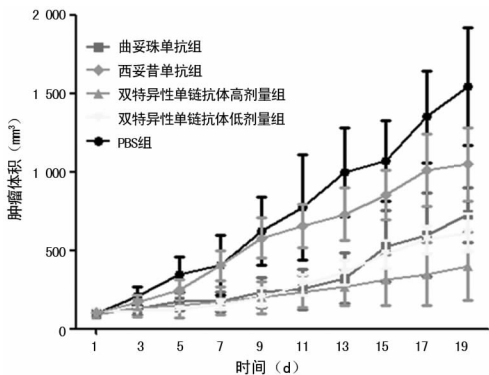


图 3 不同给药组 19 d 内荷瘤裸鼠的瘤体积变化

2.5 免疫组织化学法检测结果 在 BT474 细胞裸鼠移植瘤模型中,双特异性单链抗体显示出比其他抗体更强的抗肿瘤活性。通过进一步的免疫组织化学法检测发现,在 BT474 细胞裸鼠移植瘤模型中,双特异性单链抗体不仅能抑制 EGFR 的磷酸化,还能抑制肿瘤细胞的增殖。与 PBS 组相比,双特异性单链抗体高剂量组可以明显抑制 BT474 皮下移植瘤组织中 p-EGFR、Ki-67 的表达量。p-EGFR 和 Ki-67 表达量的减少说明靶向 HER2/EGFR 的抗体可以抑制裸鼠肿瘤细胞表面 EGFR 的磷酸化,抑制肿瘤细胞的增殖。进一步说明联合靶向 HER2/EGFR 比单靶向在抗肿

瘤方面更有前景。见图 4。

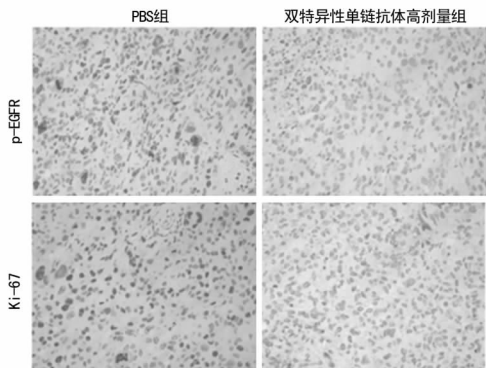


图 4 免疫组织化学法检测 BT474 裸鼠皮下移植瘤组织中 p-EGFR 及细胞增殖指标 Ki-67 的表达

3 讨 论

HER2 和 EGFR 都为乳腺癌研究的热门靶点,其在乳腺癌肿瘤细胞表面高表达,与肿瘤的发生和发展有关。但是多项研究表明单独抑制某一条通路,在乳腺癌治疗前期有较好的效果,但一段时间后治疗效果逐步降低,肿瘤产生耐药,无法进行下一步治疗。耐药的产生与肿瘤的代偿机制有关,当抑制一条通路后,另一条相关通路就会代偿性地被激活,故造成肿瘤的耐药。基于此,本研究设计出双特异性单链抗

体,其有两种特异性抗原结合位点,在肿瘤细胞的不同靶点之间同时发挥效应功能,产生协同抑制的效果,更好地发挥靶向抑制的功能;并且其相对于全长抗体的优势在于,其相对分子质量较小和生产成本较低,拥有更好的体内外渗透性,故在抗肿瘤领域拥有较好的应用价值^[10,13,17]。

本研究以双靶向 HER2 和 EGFR 的双特异性单链抗体为研究对象,考察其在体内外抑制乳腺癌 BT474 细胞的活性,获得增强的抗肿瘤功能,可以为双靶向抑制 HER2 和 EGFR 通路的乳腺癌治疗策略,以及新型抗乳腺癌药物的开发提供一定的经验和理论基础。首先设计并表达双特异性单链抗体,流式细胞术结合实验验证了改造的双特异性单链抗体保留了其原有的乳腺癌细胞靶向性。MMT 法验证了双特异性单链抗体较其他抗体更为有效的体外抗肿瘤活性。最后,利用 BT474 细胞裸鼠移植瘤模型对双特异性单链抗体体内的抗肿瘤活性进行研究,实验表明相比于其他抗体,双特异性单链抗体可以显著抑制小鼠体内移植瘤的生长,抑制 EGFR 的磷酸化和肿瘤细胞的增殖。

综上所述,双特异性单链抗体双靶向 HER2 和 EGFR 信号通路,对乳腺癌 BT474 细胞的体内外抗肿瘤作用效果优于单靶向的抗体,可以为 HER2 和 EGFR 信号通路联合治疗提供一种新的临床治疗思路和经验。

参考文献

- [1] 朱琳莲. 对乳腺癌患者进行分子靶向治疗的效果研究[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(5): 62-63.
- [2] 刘现义, 李中, 王晓春, 等. 早期乳腺癌保乳手术治疗的有効性及安全性[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2016, 23(6): 695-697.
- [3] 关润芝. 乳腺癌术后化疗后放疗与内分泌治疗同期或序贯治疗的比较[J]. 西南国防医药, 2016, 26(10): 1192-1194.
- [4] 李鹏兴. 分子靶向治疗在 HER2 阳性乳腺癌中的临床应用策略[J]. 中国实用医药, 2016, 11(29): 276-277.
- [5] 周子平, 陆剑豪. 靶向药物联合阿霉素靶向制剂治疗 Her-2 阳性乳腺癌的效果及安全性研究[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(9): 1265-1268.

- [6] 廖云梅, 罗阔, 卢家希. 免疫治疗在三阴性乳腺癌中的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(2): 177-180.
- [7] 陈唯, 夏苏建, 李鹤, 等. 曲妥珠单抗辅助治疗人表皮生长因子受体-2 阳性早期乳腺癌患者的成本效果分析[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(8): 696-701.
- [8] 桂安萍, 姚和瑞, 凌飞海. 三阴性乳腺癌细胞中上皮间质转化与 EGFR 单抗治疗效果的相关性[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(4): 249-252.
- [9] 何丹丹, 王玉德, 唐海康, 等. 具有 EGFR/HER2 双重抑制作用的小分子抑制剂的研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14(9): 913-923.
- [10] 陈治国, 邢黎军, 徐孟怀, 等. 一种全人源 IgG 样抗 EGFR/抗 KDR 双特异性抗体的构建与表达[J]. 药物生物技术, 2015, 22(3): 193-197.
- [11] 吕海燕, 刘传杰, 黄建华, 等. 抗 CD133/CD3 双特异性抗体介导的细胞因子诱导杀伤细胞体外杀伤 CD133 阳性肿瘤细胞研究[J]. 解放军医学院学报, 2015, 36(12): 1227-1231.
- [12] PRASAD S, GAEDICKE S, MACHEIN M, et al. Effective eradication of glioblastoma stem cells by local application of an AC133/CD133-Specific T-cell-engaging antibody and CD8 T cells[J]. Cancer Res, 2015, 75(11): 2166-2176.
- [13] DIERMEIER-DAUCHER S, BREINDL S, BUCHHOLZ S, et al. Modular anti-EGFR and anti-Her2 targeting of SK-BR-3 and BT474 breast cancer cell lines in the presence of ErbB receptor-specific growth factors[J]. Cytometry A, 2011, 79(9): 684-693.
- [14] 刘倩, 刘琼, 李文波, 等. ¹³¹I 标记的甲状腺未分化癌人源单链抗体在荷瘤裸鼠模型的放射免疫显像[J]. 中国医学影像学杂志, 2017, 25(5): 321-324.
- [15] BYRNE H, CONROY P J, WHISSTOCK J C, et al. A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications[J]. Trends Biotechnol, 2013, 31(11): 621-632.
- [16] 王婷, 雷佳文, 李培武, 等. 抗黄曲霉毒素单链抗体在毕赤酵母 X-33 中的表达[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(1): 113-116.
- [17] 姜文国, 张树平, 刘荣, 等. 靶向 4-1BBL 和 CD3 双信号的协同抗肿瘤作用机制研究[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(21): 1201-1204.

(收稿日期: 2018-01-02 修回日期: 2018-05-15)

(上接第 2886 页)

- [8] MILOSEVIC F J, NIVARTHI H, GISSLINGER H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms[J]. Blood, 2016, 127(3): 325-332.
- [9] VERGER E, CASSINAT B, CHAUVEAU A, et al. Clinical and molecular response to interferon- α therapy in essential thrombocythemiapaitients with CALR mutations[J]. Blood, 2015, 126(24): 2585-2591.
- [10] KLAMPFL T, GISSLINGER H, HARUTYUNYAN A

S, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms[J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2379-2390.

- [11] NANGALIA J, MASSIE C E, BAXTER E J, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2[J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2391-2405.

(收稿日期: 2018-01-06 修回日期: 2018-05-19)