

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )04-0328-05

## HER2 基因沉默抑制人胃癌细胞 SGC-7901 的生长和侵袭

鲍 炜<sup>1</sup>, 付海京<sup>2</sup>, 贾林涛<sup>2</sup>, 张 勇<sup>1</sup>, 刘家云<sup>1</sup>, 任新玲<sup>3</sup>, 温伟红<sup>1</sup>, 孟艳玲<sup>1</sup>, 杨安钢<sup>1,2\*</sup> ( 1. 第四军医大学基础医学部免疫学教研室; 2. 第四军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室; 3. 第四军医大学附属西京医院呼吸内科, 西安 710032 )

[ 摘 要 ] 目的: 探讨针对 *HER2* 基因的 RNA 干扰对人胃癌细胞生长和侵袭的影响。方法: 构建了针对癌基因 *HER2* 的 siRNA 表达载体, 分别命名为 pcDNA3-sihe1 和 pcDNA3-sihe2, 将构建的干扰载体与对照载体转染胃癌 SGC-7901 细胞, 通过间接免疫荧光实验确定干扰效果; 以软琼脂集落形成实验检测干涉后细胞的集落形成能力, 以流式细胞术检测细胞在悬浮培养条件下的凋亡情况; 并以 Boyden chamber 法检测转染后细胞的侵袭能力。结果: 成功构建针对癌基因 *HER2* 的 siRNA 表达载体, siRNA 表达载体转染 SGC-7901 细胞后 *HER2* 表达水平明显降低, 证实 siRNA 成功抑制 *HER2* 蛋白的表达。 *HER2* 低表达的细胞株集落形成能力降低, 流式细胞术检测发现 *HER2* 下调可引起胃癌细胞的凋亡, Boyden chamber 实验表明针对 *HER2* 的 RNA 干扰可抑制胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭能力。结论: RNA 干扰有效地抑制了 *HER2* 分子的表达, 进而影响 SGC-7901 细胞的生长和侵袭, 本实验为进一步研究 *HER2* 分子与肿瘤细胞生长和转移的关系奠定了基础。

[ 关键词 ] *HER2* 基因; RNA 干扰; 胃肿瘤; 侵袭

[ 中图分类号 ] R730.5 [ 文献标志码 ] A

## HER2-targeted RNA interference inhibits growth and invasion of human gastric carcinoma cell SGC-7901

BAO Wei<sup>1</sup>, FU Hai-jing<sup>2</sup>, JIA Lin-tao<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, LIU Jia-yun<sup>1</sup>, REN Xin-ling<sup>3</sup>, WEN Wei-hong<sup>1</sup>, MENG Yan-ling<sup>1</sup>, YANG An-gang<sup>1,2\*</sup> ( 1. Department of Immunology, School of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; 3. Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the effect of *HER2*-targeted RNA interference ( RNAi ) on growth and invasion of human gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods:** *HER2*-targeted hairpin small interfering RNA ( siRNA ) genes, pcDNA3-sihe1 and pcDNA3-sihe2, were obtained by oligonucleotide synthesis and annealing of the complementary single strand DNAs; they were used to transfect SGC-7901 cells *in vitro*. The expression of *HER2* gene in the transfected cells was examined by indirect immunofluorescence assay and the effects of the *HER2*-targeted siRNA on cell growth, apoptosis and invasion were evaluated by colony formation assay, flow cytometry, and Boyden chamber assay. **Results:** We successfully constructed siRNA expression vector targeting *HER2* gene. Indirect immunofluorescence assay revealed a remarkable decrease of *HER2* expression in pcDNA3-sihe1- and pcDNA3-sihe2-transfected cells, but not in pcDNA3 vector transfected cells. The colony-forming ability of cells with low expression of *HER2* was decreased. Flow cytometry demonstrated down-regulation of *HER2*, with resulted in apoptosis of gastric cancer cells. Boyden chamber assays revealed that *HER2*-targeted RNAi suppressed the invasion ability of SGC-7901 cells. **Conclusion:** *HER2*-targeted RNAi can effectively inhibit the expression of *HER2* in SGC-7901 cells and subsequently influence the growth and invasion of SGC-7901 cells, which paves a way for studying the relationship between *HER2* molecular and tumor growth and metastasis.

[ 基金项目 ] 国家重点基础研究发展( 973 )计划资助项目( No. 2004CB518805 );国家自然科学基金资助项目( No. 30500592 );教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目( IRT0459 )。 Supported by the Major State Basic Research Development Program of China ( No. 2004CB518805 ); the National Natural Science Foundation of China ( No. 30500592 ); the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team of Ministry of Education of China ( No. IRT0459 )。

[ 作者简介 ] 鲍 炜( 1976 - ), 男, 陕西省西安市人, 博士研究生, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究

\* Corresponding author. Tel: 029 - 84774528, E - mail: agyang@fmmu.edu.cn

[ **Key words** ] *HER2* gene; RNA interference; gastric neoplasms; invasion

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14(4):328-332 ]

胃癌是我国常见的消化道恶性肿瘤,病死率居我国各种恶性肿瘤之首。绝大多数患者确诊时已属进展期,此期胃癌手术治疗效果差,淋巴结转移、腹膜播散及肝转移严重影响其预后,明显降低术后生存率<sup>[1-2]</sup>。胃癌血行转移以肝脏转移为主,其发生率可达 44.5%;胃癌肝转移可占转移性肿瘤的 10%~15%<sup>[3]</sup>。目前已知,许多肿瘤的发生和转移都与特定癌基因或受体基因过表达导致的细胞过度增殖有关。其中,*HER2* 已被证实是与多种肿瘤发生、发展和转移密切相关的受体。文献<sup>[4-5]</sup>报道胃癌中 *HER2/neu* 基因的扩增比率是 10.1%~19.3%,过表达率是 10%~45%;有学者<sup>[6]</sup>报道 *HER2/neu* 基因扩增或表达常伴有胃癌转移率增高。

胃癌患者术后 3 年内有 30%~50% 出现转移, *HER2* 过表达是肿瘤转移的关键<sup>[7-8]</sup>,如何以 *HER2* 为靶点进行高效、特异的抑制,是抑制胃癌转移的关键问题。本课题构建了以 *HER2* 为靶点的 siRNA 表达载体,转染胃癌 SGC-7901 细胞,观察 *HER2* 沉默对胃癌细胞生长和侵袭的影响,为探讨 *HER2* 阳性肿瘤的基因治疗奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

人胃癌细胞系 SGC-7901、AGS 以及正常胃黏膜上皮细胞来源的细胞系 GES 均为本室保存。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  以及 pSUPER 载体均为本室保存。T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶和 DL2000 DNA Marker 购于 TaKaRa 公司。新生牛血清、DMEM 培养基、胰酶及脂质体 lipofectAMINE<sup>TM</sup>2000 购于 Gibco 公司。RT-PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司。

### 1.2 以 *HER2* 为靶点的 siRNA 的设计及真核表达载体的构建

根据人 *HER2* 基因设计 4 条寡聚脱氧核苷酸链 (oligo), 序列为: oligo1: 5'-gatccctgatagacaccaac-cgctcttcaagagagagcggttgtgtctatcattttggaaa-3'; oligo2: 5'-agcttttccaaaatgatagacaccaaccgctctctcttgaaga gcggttg-tgtctatcaggg-3'; oligo3: 5'-gatccctgaaacctgacctctctat-tcaagatagagaggtcaggtttcattttggaaa-3'; oligo4: 5'-agcttttccaaaatgaaacctgacctctctatctcttgaataggagaggtcag-gtttcaggg-3',由赛百盛公司合成。取 2 条 DNA 在退火缓冲液中退火,95  $^{\circ}\text{C}$  4 min,70  $^{\circ}\text{C}$  10 min,缓慢降温到 4  $^{\circ}\text{C}$ 。退火缓冲液组分为:100 mmol/L 醋酸

钾,30 mmol/L HEPES-KOH, 2 mmol/L 醋酸镁。取退火后的产物磷酸化,产物与经 *Hind* III 和 *Bgl* II 双酶切的 pSUPER 载体进行连接,产物命名为 pSUPER-sihe1、pSUPER-sihe2,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,挑阳性克隆酶切鉴定,测序确认插入片段序列正确。

### 1.3 筛选标记载体的构建

由于 pSUPER 载体不带有真核筛选标记,且 pcDNA3 载体有 2 个 *Spe* I 位点,恰好位于其 CMV 启动子两端,故将 pcDNA3 以 *Spe* I 酶切,去除 CMV 启动子序列,之后用 T4 连接酶将载体自身环化。再将之前构建好的 pSUPER-sihe 1、pSUPER-sihe 2 和环化后的 pcDNA3 分别以 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,将 siRNA 以及 H1 启动子连入改建后的 pcDNA3 中,使 siRNA 表达载体具有 Neo 筛选标记,命名为 pcDNA3-sihe 1 和 pcDNA3-sihe 2。

### 1.4 细胞转染

SGC-7901 细胞用 RPMI 1640 培养液(含 10% 小牛血清)在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养,转染前 24 h 将处于对数生长期的细胞重新接种于适当的容器中,长满底面积 80% 时进行转染。以重组质粒即实验组质粒 pcDNA3-sihe 1、pcDNA3-sihe 2 与对照组质粒 pcDNA3.0 各 5  $\mu\text{g}$  分别转染 SGC-7901 细胞,操作按 lipofectAMINE<sup>TM</sup>2000 说明书进行。

### 1.5 RT-PCR 检测不同细胞株中 *HER2* 的表达

用 TriZOL 试剂提取 GES、AGS 与 SGC-7901 细胞的总 RNA,采用半定量 RT-PCR 分析 *HER2* mRNA 表达。模板总量 1  $\mu\text{g}$ ,反转录酶 41.68 nkat, 0.5  $\mu\text{l}$  引物和 1  $\mu\text{l}$  dNTP(10 mmol/L),总体积 20  $\mu\text{l}$ , 42  $^{\circ}\text{C}$  60 min。取 1  $\mu\text{l}$  逆转录产物,0.5  $\mu\text{l}$  引物(20  $\mu\text{mol/L}$ )、Taq DNA 聚合酶及 dNTP(10 mmol/L)(总体积 50  $\mu\text{l}$ ) 进行 PCR。反应参数为:94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,70  $^{\circ}\text{C}$  1 min,25 个循环。以 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 RT-PCR 产物。

### 1.6 间接免疫荧光检测 *HER2* 蛋白的表达

转染前 24 h,胰酶消化 SGC-7901 细胞,加 1-2 滴至 12 孔板中的盖玻片上,37  $^{\circ}\text{C}$  孵箱放置 1 h,细胞贴壁制成细胞爬片,分别以实验组质粒 pcDNA3-sihe 1、pcDNA3-sihe 2 以及对照组质粒 pcDNA3.0 转染,获得实验组细胞与对照组细胞。转染 36 h 后将细胞爬片用 PBS(pH 7.4)洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,以 PBS 洗 2 次,经 0.01% Triton 处理,0.3% 双氧水灭活及血清封闭等处理后,依次加入适量稀释的一抗、

二抗;加一滴 PBS 封片,荧光显微镜观察并照相。

### 1.7 软琼脂集落形成实验检测细胞克隆和凋亡

配制含 10% 新生牛血清以及 RPMI 1640 培养液的底层 0.5% 琼脂,加入 12 孔板中,每孔 2 ml,室温凝固。将实验组与对照组细胞分别制备单细胞悬液并调整密度至  $1 \times 10^4$ /ml,取 0.8 ml 与 42 °C 预温 0.5% 琼脂/培养基混合物 1.2 ml 迅速混匀,取 1 ml 铺于底层琼脂上,每个样品做一复孔。凝固后培养 2 周,在显微镜下观察集落形成情况。

### 1.8 Boyden chamber 实验检测 HER2 转染后 SGC-7901 的侵袭活性

Transwell 置于 24 孔培养板中。上层小室覆盖 100  $\mu$ l 的 1:3 比例的 Matrigel/无血清 DMEM (Matrigel 1 400 mg/cm<sup>2</sup>) 混合物培养基,37 °C 放置 1~2 h。将实验组与对照组细胞分别制备单细胞悬液并以含 1% 血清的 DMEM 洗 3 次,重悬,将 100  $\mu$ l 含  $1 \times 10^6$  细胞悬液置于 Matrigel 层表面。小室下层为 300  $\mu$ l 含 1% 血清的 DMEM。侵袭能力较强的细胞可以降解人工基底膜,进而通过变形运动穿过下面的 8  $\mu$ m 小孔。37 °C 培养 24 h 后将 Transwell 取出,用棉签小心擦除上层未穿膜的细胞与 Matrigel, Giemsa 染色,剥离滤膜后正面朝下固定于载玻片上,光镜下观察。穿过的细胞越多,提示细胞的侵袭能力越强。

## 2 结果

### 2.1 真核表达载体的鉴定

将退火产物与经双酶切的载体连接,转化感受态细胞,挑取单克隆培养,小量提取质粒 DNA,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,电泳后见到一条约 291 bp 的片段,表明退火后的 siRNA 基因已插入 pSUPER 载体中,测序结果完全正确。再经引入真核筛选标记,重组质粒以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,电泳后见到一条约 306 bp 的片段,表明 siRNA 基因以及 H1 启动子已插入 pcDNA3 载体中,分别命名为 pcDNA3-sihe1 和 pcDNA3-sihe2(图 1,2)。

### 2.2 不同来源细胞株 HER2 的表达

RT-PCR 法检测几种胃癌细胞与胃粘膜上皮细胞来源的细胞中 HER2 的表达水平,结果显示,在检测的几种细胞系中,人胃癌细胞 SGC-7901 中的 HER2 表达水平较高(图 3),因此选择人胃癌细胞系 SGC-7901 作为观察干涉效果的细胞。

### 2.3 HER2 靶向 siRNA 对目的基因表达的抑制

以实验组质粒 pcDNA3-sihe1 和 pcDNA3-sihe2 以及对照组质粒 pcDNA3.0 分别转染 SGC-7901 细

胞,显微镜观察发现实验组的绿色荧光强度明显低于对照组;间接免疫荧光实验结果表明干涉组细胞表面 HER2 分子表达明显减少,证实 siRNA 成功抑制 HER2 蛋白的表达(图 4)。

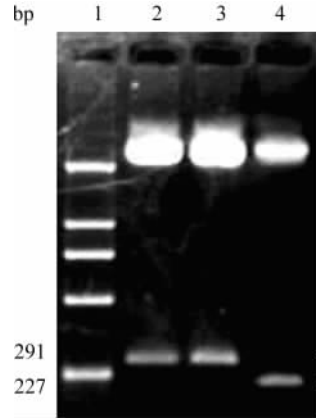


图 1 重组质粒限制性内切酶双酶切鉴定  
Fig. 1 Identification of reconstructed vector with *EcoR* I and *Hind* III digestion

1: DNA marker DL 2000; 2: pSUPER-sihe1; 3: pSUPER-sihe2; 4: pSUPER

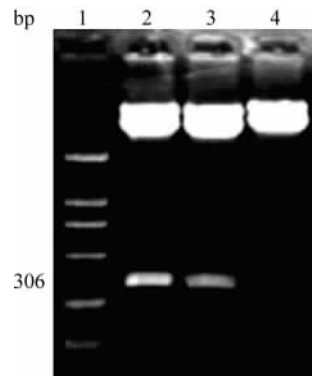


图 2 pcDNA3-sihe1 和 pcDNA3-sihe2 载体的酶切鉴定  
Fig. 2 Identification of pcDNA3-sihe1, pcDNA3-sihe2 with *EcoR* I and *Xho* I digestion

1: DNA marker DL 2000; 2: pcDNA3-sihe1; 3: pcDNA3-sihe2; 4: pcDNA3.

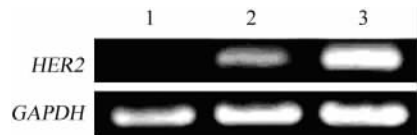


图 3 3 种细胞中 HER2 表达水平的检测  
Fig. 3 Expression of HER2 in 3 cell lines as detected by RT-PCR

1: GES; 2: AGS; 3: SGC-7901

### 2.4 HER2 沉默对 SGC-7901 细胞生长的抑制

软琼脂集落形成实验表明,与对照组细胞相比较,实验组细胞即 *HER2* 基因沉默的 SGC-7901 细胞株的克隆形成能力明显下降(图 5)。脱落培养模式来诱导细胞凋亡,进行 Annexin-V 和 PI 染色后,流式细胞术分析发现对照组细胞仍然具有抗脱落凋亡特性,脱落培养状态下未凋亡细胞比例仍维持一定水平,而稳定表达 siRNA 的 SGC-7901 细胞脱落培养时凋亡细胞明显增加。表明 siRNA 下调 *HER2* 水平而逆转 SGC-7901 细胞的抗脱落凋亡特性(图 6)。

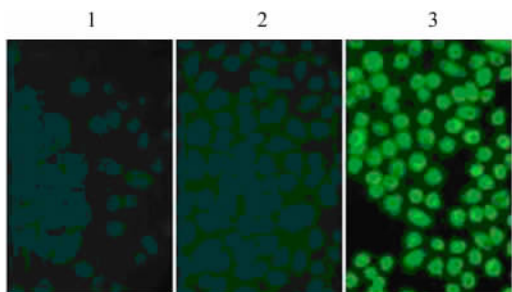


图 4 间接免疫荧光染色检测各组细胞 *HER2* 分子的表达(荧光显微镜, ×200)

Fig. 4 Immunofluorescence staining of *HER2* in SGC-7901 cells of experimental and control groups (fluorescence microscope, ×200)

1: pcDNA3-sihe1; 2: pcDNA3-sihe2; 3: pcDNA3.0

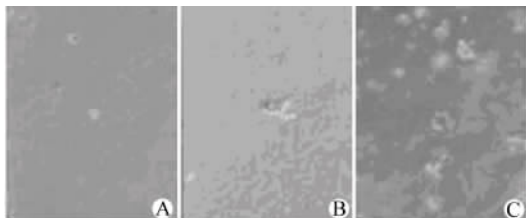


图 5 转染后 SGC-7901 细胞的克隆形成情况(光镜, ×100)

Fig. 5 Colony-formation assay of SGC-7901 cell after transfection(microscope, ×100)

A: pcDNA3-sihe1; B: pcDNA3-sihe2; C: pcDNA3.0

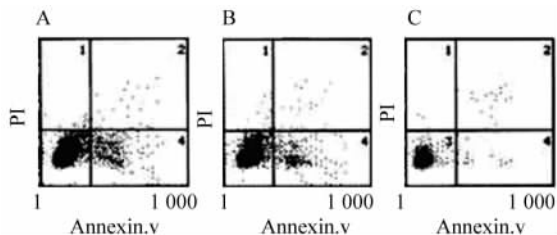


图 6 *HER2* 转染后各组细胞的凋亡情况

Fig. 6 Apoptosis of cells transfected with indicated vectors

A: pcDNA3-sihe1; B: pcDNA3-sihe2; C: pcDNA3.0

2.5 稳定表达 siRNA 的 SGC-7901 细胞体外侵袭

能力的改变

Boyden chamber 检测发现,实验组细胞穿过 8 μm 小孔的细胞数明显少于对照组细胞,表明转染了 siRNA-*HER2* 的细胞株的侵袭能力比转染对照质粒的细胞显著降低。

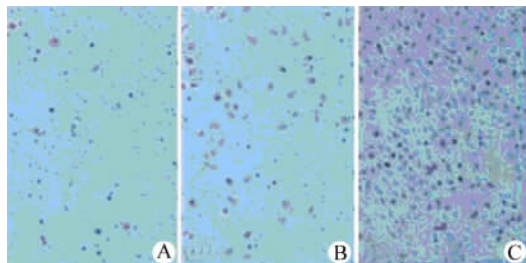


图 7 Boyden chamber 检测肿瘤细胞的侵袭能力(光镜, ×100)

Fig. 7 Invasive ability of tumor cells detected by Boyden chamber assay(microscope, ×100)

A: pcDNA3-sihe1; B: pcDNA3-sihe2; C: pcDNA3.0

3 讨论

*HER2* 是由原癌基因 *erbB2/HER2/neu* 编码的一种酪氨酸蛋白激酶。属于表皮生长因子受体(EGFR)家族<sup>[9]</sup>。研究表明,*HER2* 的过表达与肿瘤的恶性程度和转移能力密切相关。抗 *HER2* 抗体可通过细胞周期阻滞引起肿瘤生长的抑制。*HER2* 能够通过 MAPK 信号转导途径来对 VEGF 的调控,通过提高血供来增强肿瘤的恶性程度。*HER2/neu* 的过度表达通过启动多种转移相关机制而增加转移能力,包括细胞迁移率、体外侵袭力等<sup>[10]</sup>。*HER2/neu* 过度表达也影响某些黏附分子如上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)等合成,从而促进转移<sup>[11]</sup>。Pantel 等<sup>[12]</sup>研究发现在癌症患者骨髓中发现转移细胞表面有过表达的 *HER2* 分子,并且观察到在肿瘤发生的早期就会发生 *HER2* 阳性细胞的转移。Fuchs 等<sup>[13]</sup>则认为脑肿瘤的转移虽然与 *HER2* 分子表达有关,但是在早期脑肿瘤的转移中, *HER2* 分子并不起很显著的作用。Kunitomo<sup>[14]</sup>在对一个乳腺癌患者施行手术 21 个月后,在患者肝脏和胸膜发现了转移,发现两种转移的细胞表面都过表达 *HER2* 分子,用化疗配合 Trastuzumab 进行治疗,肝脏部位肿瘤得到了较为明显的抑制。另外,44% 的成骨肉瘤细胞过表达 *HER2*,且其过表达增加成骨肉瘤肺转移的危险性<sup>[15]</sup>。实验研究<sup>[16-18]</sup>表明,增加 *HER2/neu* 的表达,则增加肿瘤发生和癌细胞的转移潜能。因此,通过 RNA 干涉等方法抑制肿瘤细胞中 *HER2* 的表

达,可以在一定程度上逆转细胞的恶性表型,抑制细胞侵袭能力。

在肿瘤基因治疗中,通过人工合成特定癌基因靶向的 siRNA,或构建上述 siRNA 的表达载体,将它们导入肿瘤细胞中,可以特异性地抑制目的基因的表达。本研究针对 *HER2* mRNA 的 2 个靶点,设计了 2 个发夹状 siRNA 分子,并构建了该 siRNA 的表达载体 pSUPER-sihe1 和 pSUPER-sihe2<sup>[19]</sup>。由于 pSUPER 不具备真核筛选标记,本实验将带有 H1 启动子的 siRNA 基因经亚克隆连入已删去启动子的 pcDNA3.0 载体中。通过脂质体转染进入了人胃癌细胞系 SGC-7901 后,该载体在 H1 启动子的调控下表达 siRNA,诱发针对 *HER2* 的干涉反应。结果证实,转染 siRNA 表达载体的细胞中 *HER2* 的表达受到显著抑制。转染后的 SGC-7901 细胞中 *HER2* 下调后细胞生长和侵袭能力都受到抑制;同时观察到在脱落培养条件下,干涉组中细胞凋亡比例较对照组有显著的提高。

因此,应用 RNA 干涉技术可以有效地抑制人胃癌细胞系 SGC-7901 中 *HER2* 的过表达,阻断 *HER2* 介导的信号转导途径,从而抑制肿瘤过度增殖。本研究可望为 *HER2* 阳性肿瘤的基因治疗提供一种新思路。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Le XF, Claret FX, Lammayot A, *et al.* The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition[ J ]. *J Biol Chem.* 2003, 278 ( 26 ):23441-23450.

[ 2 ] Menendez JA, Vellon L, Oza BP, *et al.* Does endogenous fatty acid metabolism allow cancer cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? Characterization of a novel molecular connection between fatty acid synthase ( FAS ) and hypoxia-inducible factor-1alpha ( HIF-1alpha )-related expression of vascular endothelial growth factor ( VEGF ) in cancer cells overexpressing her-2/neu oncogene[ J ]. *J Cell Biochem.* 2005, 94( 5 ): 857-863.

[ 3 ] Wang SC, Lien HC, Xia W, *et al.* Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2 [ J ]. *Cancer Cell.* 2004, 6( 3 ):251-261.

[ 4 ] Khalili P, Arakelian A, Chen G, *et al.* Effect of Herceptin on the development and progression of skeletal metastases in a xenograft model of human breast cancer[ J ]. *Oncogene*, 2005, 24( 44 ): 6657-6666.

[ 5 ] Peyromaure M, Scotte F, Amsellem-Ouazana D, *et al.* Trastuzumab ( Herceptin ) in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract: report on six patients[ J ]. *Eur Urol.* 2005, 48( 5 ): 771-775.

[ 6 ] Yao T, Utsunomiya T, Oya M, *et al.* Extremely well-differentiated

adenocarcinoma of the stomach: clinicopathological and immunohistochemical features[ J ]. *World J Gastroenterol.* 2006, 12 ( 16 ): 2510-2516.

- [ 7 ] Ferretti G, Felici A, Papaldo P, *et al.* HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend[ J ]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007, 19( 1 ): 56-62.
- [ 8 ] Traina A, Agostara B, Maras L, *et al.* HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients[ J ]. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1089: 159-167.
- [ 9 ] Tiseo M, Loprevite M, Ardizzoni A. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new prospective in the treatment of lung cancer [ J ]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2004, 4( 2 ): 139-148.
- [ 10 ] Galiegue S, Casellas P, Kramer A, *et al.* Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10( 6 ): 2058-2064.
- [ 11 ] Kleer CG, van Golen KL, Braun T, *et al.* Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer[ J ]. *Mod Pathol*, 2001, 14( 5 ): 458-464.
- [ 12 ] Pantel K, Woelfle U. Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anti-cancer therapy [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1756( 1 ): 53-64.
- [ 13 ] Fuchs IB, Loebbecke M, Buhler H, *et al.* HER2 in brain metastases: issues of concordance, survival, and treatment[ J ]. *J Clin Oncol*, 2002, 20( 19 ): 4130-4133.
- [ 14 ] Kunitomo K, Inoue S, Ichihara F, *et al.* A case of metastatic breast cancer with outgrowth of HER2-negative cells after eradication of HER2-positive cells by humanized anti-HER2 monoclonal antibody ( trastuzumab ) combined with docetaxel[ J ]. *Hum Pathol*, 2004, 35( 3 ): 379-381.
- [ 15 ] Zhou H, Randall RL, Brothman AR, *et al.* Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification[ J ]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2003, 25( 1 ): 27-32.
- [ 16 ] Niu G, Carter WB. Human epidermal growth factor receptor 2 regulates angiopoietin-2 expression in breast cancer via AKT and mitogen-activated protein kinase pathways[ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67 ( 4 ): 1487-1493.
- [ 17 ] Saal LH, Johansson P, Holm K, *et al.* Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104( 18 ): 7564-7569.
- [ 18 ] Yokoyama H, Ikehara Y, Kodera Y, *et al.* Molecular basis for sensitivity and acquired resistance to gefitinib in HER2-overexpressing human gastric cancer cell lines derived from liver metastasis[ J ]. *Br J Cancer*, 2006, 95( 11 ): 1504-1513.
- [ 19 ] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[ J ]. *Science*, 2002, 296( 5567 ): 550-553.

[ 收稿日期 ] 2007-04-20

[ 修回日期 ] 2007-06-04

[ 本文编辑 ] 韩 丹