

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2008 )02-0105-05

· 论 著 ·

## 重组抗 HER2 融合蛋白基因 *ScFv/tBid* 对骨肉瘤 E10 细胞的促凋亡作用

裘秀春<sup>1</sup>, 单乐群<sup>1</sup>, 纪振钢<sup>1</sup>, 杨彤涛<sup>1</sup>, 龙 华<sup>1</sup>, 许彦鸣<sup>2</sup>, 周 勇<sup>1</sup>, 马保安<sup>1</sup>, 杨安钢<sup>3\*</sup>, 范清宇<sup>1\*</sup> ( 第四军医大学 1. 唐都医院 骨科; 2. 基础部 生物化学与分子生物学教研室; 3. 基础部 免疫学教研室, 西安 710038 )

[ 摘 要 ] 目的: 构建抗 HER2 重组融合蛋白基因 *ScFv/tBid*, 并探讨其对骨肉瘤 E10 细胞的促凋亡作用。方法: 通过间接免疫荧光染色、流式细胞仪( FCM )检测 E10 细胞膜表面 HER2 的表达。将抗 HER2 单链抗体基因 *e23sFv* 与铜绿假单胞菌外毒素 PE 的转膜结构域基因( *PE II* )和 *tBid* 基因连接, 构建抗 HER2 重组融合蛋白基因 *ScFv/tBid*, 将其克隆入真核表达载体 pCMV 中构建重组 pCMV-*ScFv/tBid* 载体, 转染骨肉瘤 E10 细胞。间接免疫荧光法检测目的蛋白表达和细胞形态学变化, Annexin V 染色流式细胞术及 TUNEL 法检测 E10 细胞的凋亡情况。结果: 流式细胞仪检测到 E10 细胞膜表面有 HER2 的表达。成功构建重组融合蛋白基因质粒 pCMV-*ScFv/tBid*。重组质粒转染 E10 细胞后, 间接免疫荧光双标记染色检测到 E10 细胞中 *tBid* 的过表达; 细胞色素 C 在细胞质中出现; 细胞出现明显的固缩、核浓缩等形态特征。Annexin V 染色后流式细胞仪检测可见实验组细胞凋亡率较对照组明显升高( 16.1% vs 4.5% ); TUNEL 染色显示, E10 细胞出现典型的凋亡特征。结论: 重组抗 HER2 融合蛋白基因 *ScFv/tBid* 可以在转染的骨肉瘤 E10 细胞中表达, 并诱导骨肉瘤细胞发生凋亡。

[ 关键词 ] *tBid*; 人表皮生长因子受体 2; 融合蛋白; 骨肉瘤细胞; 细胞凋亡

[ 中图分类号 ] R738.1; R730.54

[ 文献标志码 ] A

## Pro-apoptotic effect of recombinant anti-HER2 fusion protein *ScFv/tBid* gene on osteosarcoma E10 cells

QIU Xiu-chun<sup>1</sup>, SHAN Le-qun<sup>1</sup>, JI Zhen-gang<sup>1</sup>, YANG Tong-tao<sup>1</sup>, LONG Hua<sup>1</sup>, XU Yan-ming<sup>2</sup>, ZHOU Yong<sup>1</sup>, MA Bao-an<sup>1</sup>, YANG An-gang<sup>3\*</sup>, FAN Qing-yu<sup>1\*</sup> ( 1. Department of Orthopedics, Tangdu Hospital; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Preclinical Medicine; 3. Department of Immunology, Faculty of Preclinical Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China )

[ Abstract ] **Objective:** To construct a fusion gene *ScFv/tBid* against HER2 and investigate its pro-apoptotic effect on osteosarcoma cell line E10. **Methods:** HER2 expression on the surface of E10 cells was detected by immunofluorescent staining and flow cytometry ( FCM ), then *e23sFv* fragment, a single-chain HER2 antibody, was linked with a PE translocation domain ( PE aa253 - 364 ) and *tBid*. The recombinant *tBid* gene was cloned into a pCMV plasmid to obtain pCMV-*ScFv/tBid*, which was then transfected into E10 cells. Immunofluorescent staining was used to examine the expression of target protein and morphological changes of cells. Meanwhile, the pro-apoptotic effect of *ScFv/tBid* gene was analyzed by Annexin V-FITC staining and TUNEL staining. **Results:** Flow cytometry showed HER2 expression on cell surface, and the recombinant plasmid, pCMV-*ScFv/tBid*, was successfully constructed and transfected into E10 cells. Overexpression of *tBid* protein was detected in E10 cells as revealed by immunofluorescent staining; and shrinkage and nuclear condensation were also noticed in E10 cells. Annexin V-FITC staining and FCM revealed that the apoptosis rate of E10 cells was 16.1% after transfection with pCMV-*ScFv/tBid*; the apoptosis rate in the control cells was 4.5%. TUNEL staining showed typical apoptosis characteristics of E10 cells after transfection. **Conclusion:** The recombinant anti-HER2 fusion gene, *ScFv/tBid*, can be expressed in E10 cells transfected with pCMV-*ScFv/tBid*, and subsequently induce apoptosis.

[ Key words ] BH3 interacting death agonist ( *tBid* ); human epidermal growth factor receptor-2( HER2 ); fusion

[ 基金项目 ] 国家杰出青年科学基金资助项目( No. 39925036 ); 国家自然科学基金重点项目( No. 30330610 ); 国家自然科学基金资助项目( No. 30471988 ); 中国博士后基金资助项目( No. 2005038259 )。Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China ( No. 39925036 ); the Major National Natural Science Foundation of China ( No. 30330610 ); the National Natural Science Foundation of China ( No. 30471988 ); the National Postdoctoral Research Foundation of China ( No. 2005038259 )

[ 作者简介 ] 裘秀春( 1963- ), 女, 浙江省嵊州市人, 副主任技师, 博士, 主要从事骨肉瘤免疫治疗方面的研究, E-mail: qiuxiuchun@hotmail.com

\* Corresponding author. 范清宇, E-mail: bonetm@fmmu.edu.cn; 杨安钢, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

protein; osteosarcoma cell; apoptosis

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15(2): 105-109 ]

Bid (BH3 interacting death agonist) 是一个只含 BH3 结构域的促凋亡的 Bcl-2 家族成员。通常情况下, Bid 分子定位于细胞质中, 并不表现其促凋亡的活性。当凋亡信号刺激后, 能够被 caspase-8、granzyme B、calpains 和 cathepsins 等多种蛋白酶剪切活化, 去除 N 末端后的截短片段( truncated Bid, tBid) 从细胞质转位到线粒体, 使线粒体通透性改变, 释放细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 和其他的促凋亡分子调节细胞凋亡<sup>[1-5]</sup>。

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的骨原发性恶性肿瘤。有 40% ~ 45% 成骨肉瘤及 58% 的成骨肉瘤肺转移癌<sup>[6-7]</sup> 存在人表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 特异性高表达, 并且 HER2 表达量越高, 肿瘤的恶性程度越高, 患者预后也越差<sup>[8-10]</sup>。本研究中以 HER2 为靶点构建抗 HER2 的 ScFv/tBid 融合蛋白基因, 研究该重组蛋白对骨肉瘤 E10 细胞的促凋亡作用, 探索其在骨肉瘤治疗中的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

由信号肽、HER2 单链抗体 e23sFv、与铜绿假单胞菌外毒素 PE 的转膜结构域 (PE II) 和活性 AIF 基因融合组成的重组 immuno-AIF 基因表达载体由于翠娟博士构建<sup>[11]</sup>。pCMV 空载体、pcDNA3-tBid61 质粒<sup>[12]</sup>、pcDNA3-PE/tBid61 质粒<sup>[13]</sup> 由本室构建和保存。DH5 $\alpha$  感受态细菌、人骨肉瘤细胞系 E10 由本室保存<sup>[14-15]</sup>。RPMI 1640、脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000、新生牛血清均购自 Invitrogen 公司。山羊抗人 tBid 多克隆抗体、兔抗人 Cyt C 多克隆抗体、鼠抗人 HER2 单克隆抗体、Isotype 为 Santa Cruz 公司产品; Biotin 标记的兔抗羊 IgG、FITC 标记的山羊抗兔 IgG、DAPI、Avidin-Cy3 为 Molecular Probes 公司产品; TUNEL 检测试剂盒为 Oncogene 公司产品; 限制性核酸内切酶 Xba I、EcoR I、Not I、T4 DNA ligase 均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 流式细胞术 (FCM) 检测骨肉瘤 E10 细胞中 HER2 的表达

制备 HER2 活性高的骨肉瘤 E10 细胞悬液; 用 10% FCS RPMI 1640 调整细胞密度为  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /ml; 取 40  $\mu$ l 细胞悬液加入预先有鼠抗人 HER2 抗体 (5 ~ 50  $\mu$ l) 的小玻璃管或塑料离心管,

再加 50  $\mu$ l 1:20 (用 DPBS 稀释) 灭活正常兔血清, 4  $^{\circ}$ C 30 min; 用洗涤液洗涤 3 次, 每次加洗涤液 2 ml, 离心 1 000 r/min  $\times$  5 min。弃上清, 加入 100  $\mu$ l 1:60 羊抗鼠荧光标记物, 充分振摇, 4  $^{\circ}$ C 30 min; 用洗涤液洗涤 3 次; 4  $^{\circ}$ C 离心 1 000 r/min  $\times$  5 min; 加入 1 ml 固定液, 混匀, 行流式细胞术分析。

### 1.3 重组 pCMV-ScFv/tBid 载体的构建

取质粒 immuno-AIF, 用 Not I、Xba I 双酶切, 回收约 6 500 bp 的 pCMV-e23sFv 载体片段; 用 Not I、EcoR I 双酶切, 回收约 333 PE II 片段; 另取质粒 pcDNA3-tBid61, 用 EcoR I、Xba I 双酶切, 回收约 400 bp 的 tBid 基因片段, 用 T4 DNA ligase 连接载体片段和 PE II、tBid 两片段转化、涂皿、过夜生长, 挑取单克隆培养, 提取质粒, 以 EcoR I、Xba I 双酶切和 Not I、Xba I 双酶切鉴定和序列测定。

### 1.4 细胞转染

将处于对数生长期的 E10 细胞, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后, 以  $1 \times 10^6$ /孔接种于 6 孔板中, 继续培养 24 h。待 80% 以上贴壁后, 吸出培养液, 用 RPMI 1640 将细胞冲洗 2 遍。取 3  $\mu$ g/孔的 pCMV-ScFv/tBid 和 pCMV 空载体分别溶于 500  $\mu$ l RPMI 1640 培养液, 称为 A1, A2 液; 将 2 份 6  $\mu$ l/孔的 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 各溶于 500  $\mu$ l RPMI 1640 培养液, 室温孵育 5 min, 为 B1, B2 液; 将 A1、B1、A2、B2 两液分别混合, 轻轻摇动, 室温孵育 20 min, 缓缓滴加至洗过的细胞中, 于 37  $^{\circ}$ C、50 ml CO<sub>2</sub> 条件下培养 6 h。吸弃转染液, 加入 1 ml 含 200 ml/L 小牛血清的无抗生素的 RPMI 1640 培养液, 继续培养。

### 1.5 间接免疫荧光染色观察转染后 E10 细胞的细胞形态和 ScFv/tBid 融合蛋白表达

制备细胞爬片, 经转染 72 h 后, 以 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 0.1 ml/L Triton X-100 处理, 30 ml/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化物酶, 再以正常山羊血清进行封闭。依次加入一抗、生物素化的二抗或 FITC 标记的二抗、Avidin-Cy3 和 DAPI, 以荧光显微镜观察并照相。

### 1.6 流式细胞术检测 pCMV-ScFv/tBid 转染后细胞的凋亡

将 E10 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度接种于六孔板中, 用 pCMV-ScFv/tBid (实验组) 及空载体 pCMV (对照组) 转染 E10 细胞并收集转染后 72 h 的细胞, PBS 洗涤后进行 Annexin V-FITC 和 PI 染色, 用流式

细胞仪检测分析。

### 1.7 TUNEL 染色检测 pCMV-ScFv/tBid 转染后细胞的凋亡

按照 TdT-FragELTM DNA fragmentation detection kit 说明进行操作。操作步骤:(1)细胞爬片酒精固定或切片按常规脱蜡至水;(2)蛋白酶 K 20 mg/L, 37 °C 消化 20 min, 1 × TBS 洗涤, 5 min × 3;(3) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断内源性辣根过氧化物酶 5 min, 洗涤同上;(4) 1 × 平衡缓冲液室温 10 ~ 30 min, 轻轻擦去多余液体;(5) 加 TdT 标记反应混合液 37 °C 90 min(57 μl TdT labeling reaction mix, 3 μl TdT enzyme) 覆盖 parafilm 膜, 确保反应混合物的平均分布;(6) 移去盖膜, 洗涤;(7) 阻断液( stop buffer) 室温 5 min, 洗涤;(8) 加 blocking buffer 室温 10 min;(9) 加 1 × conjugate 反应混合液, 室温 30 min, 洗涤;(10) DAB 显色 5 ~ 10 min;(11) 甲基绿衬染 1 ~ 3 min;(12) 常规脱水、透明、封片。

另设阴性对照, 实验步骤同前, 用无 DNA 末端转移酶的标记液代替 TUNEL 反应混合液; 阳性对照使用地塞米松( 1 μmol/L) 处理 3 ~ 4 h 的小鼠胸腺细胞。

## 2 结果

### 2.1 E10 细胞膜表面 HER2 的表达

将 E10 细胞以  $1 \times 10^6$ /孔的密度接种于 6 孔板中, 24 h 后收集细胞进行间接免疫荧光染色( 一抗分别为鼠抗人 HER2 抗体和 Isotype, 二抗为 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG ), FCM 分析。结果显示, E10 细胞膜表面 HER2 表达 28.5%, 而无关对照组 HER2 表达为 2.1%( 图 1 )。

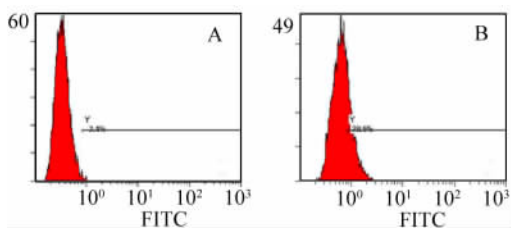


图 1 FCM 检测 E10 细胞表面 HER2 分子的表达

Fig. 1 Expression of HER2 in E10 cells by FCM

A: Isotype; B: HER2

### 2.2 重组 pCMV-ScFv/tBid 载体的成功构建

在已有 pCMV-e23sFv-PE-AIF 载体和 pcDNA3-tBid61 载体的基础上, 通过 *Not* I、*Eco*R I 和 *Xba* I 酶切位点, 将 pCMV-e23sFv 载体片段、PE II( 253 ~

364 ) 片段和 *tBid61* 基因片段相连接, 构建 pCMV-e23sFv-PE II( 253 ~ 364 )-tBid61 载体, 并以 *Eco*R I、*Xba* I 双酶切和 *Not* I、*Xba* I 双酶切鉴定, 电泳结果显示, 切出了约 400 bp 和 750 bp 的重组蛋白编码序列片段, 与预期大小一致, 且经测序证实, 将重组载体命名为 pCMV-ScFv/tBid( 图 2 )。

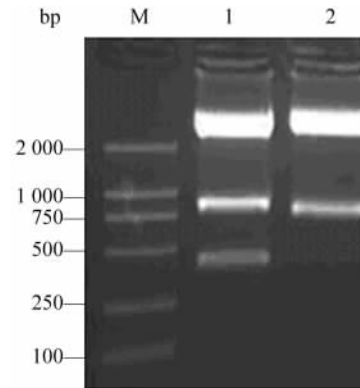


图 2 重组质粒 pCMV-ScFv/tBid 的酶切鉴定

Fig. 2 Endonuclease digestion of recombinant plasmid pCMV-ScFv/tBid

M: Marker; 1: pCMV-ScFv/tBid/*Eco*R I + *Xba* I ;

2: pCMV/*Not* I + *Xba* I

### 2.3 重组质粒转染后 E10 细胞形态和 Bid 蛋白表达的改变

荧光显微镜观察结果显示, 转染 pCMV 的对照组细胞生长良好, Bid 蛋白在细胞质中均匀分布, Cyt C 在线粒体中呈点状分布, 仅微量表达; 转染了目的基因的细胞生长状态较差, 细胞数目减少, 有目的蛋白的过表达, 同时出现了明显的细胞固缩、核浓缩、Cyt C 释放到质中等凋亡特征( 图 3 )。

### 2.4 重组 *tBid* 基因引发 E10 细胞凋亡的 FCM 检测结果

pCMV-ScFv/tBid 转染 E10 细胞 72 h 后, 收集细胞, 行 Annexin V-FITC 和 PI 染色, FCM 检测。实验组可检测到明显的凋亡细胞, 与对照组( 凋亡率为 4.5% ) 相比, 实验组的凋亡率升高( 凋亡率为 16.1% ), 凋亡后继发坏死细胞占 26.3%( 图 4 )。

### 2.5 重组 *tBid* 基因引发 E10 细胞凋亡的 TUNEL 检测结果

pCMV-ScFv/tBid 转染 E10 细胞 72 h 后行 TUNEL 检测, 结果显示, 实验组细胞出现细胞核固缩、染色体断裂等凋亡细胞形态; 对照组细胞核形态正常, 可被甲基绿衬染。图 5 中兰绿色代表 TUNEL 染色阴性的正常细胞核; 棕黑色代表 TUNEL 染色阳性的发生凋亡的细胞核。

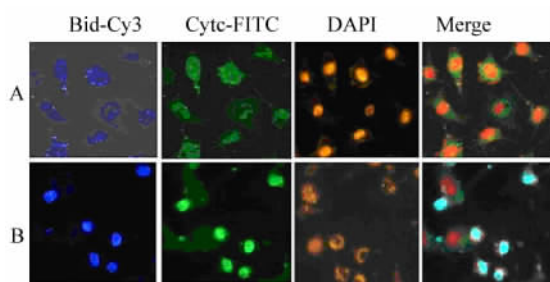


图3 间接免疫荧光法检测转染 pCMV-ScFv/tBid 后 E10 细胞的形态变化( ×1 000 )

Fig. 3 Morphologic changes of E10 cells after pCMV-ScFv/tBid transfection as detected by immunofluorescent staining ( ×1 000 )

A: pCMV; B: pCMV-ScFv/tBid

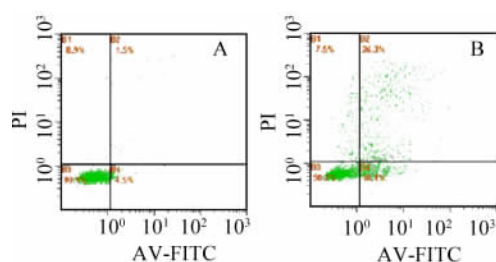


图4 Annexin V-FITC 染色检测重组 tBid 基因过表达引发 E10 细胞的凋亡

Fig. 4 Detection of E10 cell apoptosis induced by overexpression of recombinant tBid gene by Annexin V-FITC staining

A: Transfection with pCMV; B: Transfection with pCMV-ScFv/tBid

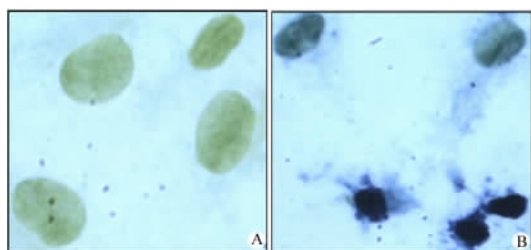


图5 tBid 融合蛋白的表达诱导骨肉瘤 E10 细胞凋亡的 TUNEL 检测( ×1 000 )

Fig. 5 TUNEL staining of E10 cells apoptosis induced by iBid fusion protein( ×1 000 )

A: Cells transfected with pCMV, the nucleus with cyan is normal; B: Cells transfected with pCMV-ScFv/tBid, the nucleus with brown is apoptotic

### 3 讨论

Bid 是 Bcl-2 家族 BH3 亚家族的一个成员,具有促凋亡活性。Bid 蛋白只含有 BH3 结构域,其促凋亡活性依赖于 caspase-8 的剪切,切割后产生的截短型 Bid 即 tBid,从细胞质转移到线粒体后,可引起线粒体本身功能障碍,并引起线粒体细胞色素 C ( Cyt C )和其他凋亡因子(如凋亡诱导因子 AIF)的释放。细胞色素 C 可激活 apaf-1-caspase-9 凋亡体,从而激活下游的 caspase-3、6 和 7,启动 caspase 信号通路而导致凋亡。而 AIF( apoptosis inducing factor )从线粒体释放出来后,从细胞质转移到细胞核内,并诱导大片段 DNA 剪切,从而介导独立于 caspases 通路的凋亡<sup>[1-2,16-17]</sup>。Bid 通过这两条不同的途径发挥促凋亡作用,使其具有更广的应用前景。

HER2 是表皮生长因子( EGF )受体家族成员之一,胞内域具有酪氨酸激酶活性。其基因的扩增和过表达存在于多种肿瘤组织,包括 20% ~ 25% 卵巢癌和乳腺癌,35% ~ 45% 胰腺癌,90% 结肠直肠癌,16% ~ 57% 非小细胞肺癌( NSCLC )<sup>[3]</sup>以及 58% 骨肉瘤肺转移癌<sup>[6-7]</sup>等,成为一种公认的肿瘤标志物,是抗肿瘤治疗的理想靶位<sup>[18]</sup>。e23sFv 是一种对 HER2 抗原具有较高亲和力的单链抗体<sup>[19]</sup>。

抗 HER2 抗体可作为导向系统,将效应分子有选择地输送到 HER2 阳性的肿瘤细胞,特异地发挥杀伤作用。目前已有多个抗 HER2 抗体为导向分子的免疫毒素( immunotoxin )进入临床实验。通过对人体正常细胞(如淋巴细胞或肌细胞等)进行基因修饰,使之分泌能特异性识别并杀伤肿瘤细胞的效应分子,是肿瘤生物治疗的一种新策略,具有长期、持续、特异等优点。Chen 等<sup>[20]</sup>构建以肿瘤细胞膜表面表达的 HER2 抗原作为靶分子的免疫毒素,选择性地杀伤 HER2 抗原阳性的肿瘤细胞。他们将一段信号肽、单链抗体 e23sFv 及铜绿假单胞菌外毒素 PE40 的转膜结构域( domain II )和效应域( domain III )基因进行融合,构建重组免疫毒素基因 e23sFv-PE40,转染人 T 淋巴细胞,获得一类能分泌产生免疫毒素的新型杀伤细胞。在此基础上, Jia 等<sup>[21]</sup>构建了一种新型的靶向促凋亡分子( immuocasp-3 ),该分子保留了针对 HER2 抗原的单链抗体 e23sFv 以及 PE40 的转膜结构域( domain II ),而在 C 端又连接了一种具有自发活性的 caspase-3 分子。实验证实,这种分泌产生的融合蛋白能特异地识别 HER2 阳性肿瘤细胞,并内化入肿瘤细胞发挥杀伤效应。Zhao 等<sup>[22]</sup>、Wang 等<sup>[23]</sup>也构建了由 HER2 抗体介导

靶向识别、活性粒酶 B (granzyme B, GrB) 介导杀伤的靶向融合蛋白 (immuno-GrB)。Xu 等<sup>[24]</sup>则以活性形式的 caspase-6 分子作为效应分子,此种分子能够对细胞核纤层蛋白进行剪切,从而使肿瘤细胞发生凋亡。Yu 等<sup>[11]</sup>构建了重组 AIF 融合蛋白对 HER2 阳性肿瘤的选择性促凋亡作用。由于 tBid 分子小并且诱导凋亡的作用强而迅速,因此本研究以 tBid 作为效应分子,将重组的抗 HER2 融合蛋白基因 *ScFv/tBid* 转染骨肉瘤 E10 细胞,观察其对 HER2 阳性骨肉瘤 E10 细胞的凋亡诱导作用。通过间接免疫荧光的方法从细胞形态学的变化来检测凋亡,观察到转染目的基因后有细胞固缩、核浓缩等凋亡特征。进一步通过 Annexin V 染色、流式细胞仪检测,与对照组相比,实验组细胞凋亡率升高(凋亡率由 4.5% 增至 16.1%),说明细胞膜表面有磷脂酰丝氨酸外翻。TUNEL 染色显示 E10 细胞出现典型的凋亡特征。表明重组融合蛋白基因 *ScFv/tBid* 表达后有促凋亡作用。本研究可为 HER2 阳性肿瘤的治疗提供一种新的思路。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death [ J ]. *Gene*, 2006, 369: 7-19.
- [ 2 ] Esposti MD. The roles of Bid [ J ]. *Apoptosis*, 2002, 7( 5 ): 433-440.
- [ 3 ] Baxevasis CN, Sotiropoulou PA, Sotiriadou NN, *et al.* Immunobiology of HER-2/neu oncoprotein and its potential application in cancer immunotherapy [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53( 3 ): 166-175.
- [ 4 ] Waterhouse NJ, Sedelies KA, Trapani JA. Role of bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis [ J ]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84( 1 ):72-78.
- [ 5 ] Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis [ J ]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17( 6 ):617-625.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] Morris CD, Gorlick R, Huvos G, *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic indicator in Osteogenic Sarcoma [ J ]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, ( 382 ):59-65.
- [ 8 ] Gorlick R, Huvos AG, Heller G, *et al.* Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma [ J ]. *J Clin Oncol*, 1999, 17( 9 ): 2781-2788.
- [ 9 ] 裘秀春,单乐群,许彦鸣,等. 骨肉瘤 HER2 基因表达增加肺转移发生危险度[ J ]. *实用医学杂志*, 2006, 22( 2 ):123-124.
- [ 10 ] 裘秀春,单乐群,许彦鸣,等. HER2 基因表达与骨肉瘤预后 [ J ]. *现代肿瘤医学*, 2006, 6( 14 ):742-744.
- [ 11 ] Yu CJ, Jia LT, Meng YL, *et al.* Selective proapoptotic activity of a secreted recombinant antibody/AIF fusion protein in carcinomas overexpressing HER2 [ J ]. *Gene Ther*, 2005, 13( 4 ): 313-320.
- [ 12 ] 裘秀春,于翠娟,许彦鸣,等. 截短型人 Bid 融合蛋白对 HeLa 细胞的促凋亡作用[ J ]. *第四军医大学学报*, 2003, 24( 21 ):1963-1966.
- [ 13 ] 裘秀春,于翠娟,孟艳玲,等. 截短型 bid 基因的克隆、表达及促凋亡作用[ J ]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20( 01 ):19-22.
- [ 14 ] 杨彤涛,范清宇,张殿忠,等. 人成骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 的建立及其生物学特性的观察[ J ]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17( 2 ):120-121.
- [ 15 ] 陈翔,杨彤涛,马保安,等. 不同转移潜能骨肉瘤细胞株筛选与建立的实验研究[ J ]. *华南国防医学杂志*, 2005, 19( 1 ):32-34.
- [ 16 ] Penalzoza C, Orlanski S, Ye Y, *et al.* Cell death in mammalian development [ J ]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14( 2 ):184-96.
- [ 17 ] Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control [ J ]. *Cell Death Differ*, 2006, 13( 8 ):1351-1359.
- [ 18 ] Penault-Llorca F. Targeted therapies: the question of target detection and evaluation [ J ]. *Bull Cancer*, 2007, 94( 7 Suppl ): 245-248.
- [ 19 ] Batra JK, Kasprzyk PG, Bird RE, *et al.* Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing pseudomonas exotoxin [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89( 13 ): 5867-5871.
- [ 20 ] Chen SY, Yang AG, Chen JD, *et al.* Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells [ J ]. *Nature*, 1997, 385( 6611 ): 78-80.
- [ 21 ] Jia LT, Zhang LH, Yu CJ, *et al.* Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3 [ J ]. *Cancer Res*, 2003, 63( 12 ): 3257-3262.
- [ 22 ] Zhao J, Zhang LH, Jia LT. *et al.* Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells [ J ]. *J Biol Chem*, 2004, 279( 20 ):21343-21348.
- [ 23 ] Wang T, Zhao J, Ren JL, *et al.* Recombinant immunoproapoptotic proteins with furin site can translocate and kill HER2-positive cancer cells [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 24 ): 11830-11839.
- [ 24 ] Xu YM, Wang LF, Jia LT, *et al.* A caspase-6 and anti-human epidermal growth factor receptor-2 ( HER2 ) antibody chimeric molecule suppresses the growth of HER2-overexpressing tumors [ J ]. *J Immunol*, 2004, 173( 1 ): 61-67.

[ 收稿日期 ] 2007 - 11 - 08

[ 修回日期 ] 2008 - 02 - 15

[ 本文编辑 ] 韩丹