

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·04·005

抑制结肠癌细胞与肝窦内皮细胞黏附的功能性抗体的初步研究

孙力超,冉宇靓*, 遇 琰,胡 海,钟 星,孙立新,杨治华(中国医学科学院 中国协和医科大学肿瘤研究所 细胞及分子生物学研究室,北京 100021)

[摘要] 目的: 研制抑制结肠癌细胞与肝窦血管内皮细胞黏附的功能性单抗, 鉴定该单抗识别的抗原分子。方法: 以人肝窦内皮细胞(human liver sinusoidal endothelial cell, HLSEC)免疫 BALB/c 小鼠, 将小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 采用甲基纤维素选择培养液培养, 制备抗 HLSEC 的单克隆抗体库。采用免疫荧光染色、黏附实验等方法筛选、鉴定能抑制结肠癌 Ls174T 细胞与肝窦内皮细胞黏附的功能性单克隆抗体。提取肝窦内皮细胞膜蛋白, 采用 Western blotting 方法鉴定单抗识别的功能性抗原蛋白。结果: HLSEC 免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞融合后产生 1 440 个杂交瘤株, 获得 119 株产生抗 HLSEC 抗体的阳性克隆, 其中 20 株能显著抑制具有肝转移能力的结肠癌 Ls174T 细胞与 HLSEC 的黏附; 其中 15 株为 IgM 型, 3 株为 IgG 型, 2 株测不到重链; 其中 1 株抗黏附能力最强的单抗(黏附抑制率为 51%)命名为 12B6, 该单抗在 5~200 μg/ml 范围内显著阻断 HLSEC 与 Ls174T 的黏附, 且呈剂量依赖性; 单抗 12B6 所识别的 HLSEC 抗原蛋白的相对分子质量为 46 000。结论: 建立了抗 HLSEC 单克隆抗体库, 获得了 20 株具有抑制结肠癌细胞与肝窦血管内皮细胞黏附的功能性抗体, 初步鉴定了一种可能参与结肠癌肝转移的黏附分子, 为结肠癌的组织器官特异转移机制及靶向治疗的研究奠定了一定的基础。

[关键词] 结肠癌; 肝窦内皮细胞; 黏附; 功能性单克隆抗体; 抗原

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)04-0321-05

Establishment of functional antibodies for inhibition on adhesion between colon cancer and human liver sinusoidal endothelial cells

SUN Li-chao, RAN Yu-liang*, YU Long, HU Hai, ZHONG Xing, SUN Li-xin, YANG Zhi-Hua (Department of Cell and Molecular Biology, Cancer Institute, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To screen for functional monoclonal antibody which can inhibit the adhesion between colon cancer cells and human liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), and to identify the specific antigen of the screened antibody. **Methods:** BALB/c mice were immunized with LSECs, the spleen cells of the immunized mice were fused with SP2/0 cells and cultured on methyl cellulose to establish anti-LSECs monoclonal antibody library. Functional monoclonal antibodies which inhibited the adherence between colon cancer cells (Ls174 T cells) and LSECs were screened and identified by immunofluorescence, ELISA and adhesive assay. The membrane proteins were extracted from LSECs and the specific antigen recognized by monoclonal antibody was detected by Western blotting assay. **Results:** Totally 1 440 monoclonal antibody clones were obtained by the fusing spleen cells of immunized mice with SP2/0 cells, 199 of the monoclonal antibodies recognized LSECs; and 20 clones, including 15 IgM type, 3 IgG type, and 2 with the heavy strand undetectable, significantly suppressed the adherence between colon cancer cells and LSECs. One of these clones with the strongest anti-adhesive ability (inhibitory rate 51%) significantly inhibited the adhesion between colon cancer cells and HLSECs at 15–200 μg/ml in a dose-dependent manner and reacted with antigens of 46 kD. **Conclusion:** We have successfully established an anti-HLSEC monoclonal antibody library and obtained 20 functional monoclonal antibodies which can suppress the adherence of colon cancer cells with LSECs. One adhesive molecule which might mediate colon cancer liver metastasis has been preliminarily identified. These antibodies may help to understand the mechanism of organ-specific metastasis of colon cancer cells and shed light on anti-metastasis therapy of colon cancer.

[Key words] colon cancer; liver sinusoidal endothelial cell; adhesion; functional monoclonal antibody; antigen

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 321-325]

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 30570818); 国家重点基础研究发展规划(973)资助项目(No. 2002CB513106). Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30570818); the Major State Basic Research Development Program of China(No. 2002CB513106)

[作者简介] 孙力超(1980-),男,山西省太原市人,博士,主要从事肿瘤抗体工程研究工作

* Corresponding author. E-mail: ran_yuliang@126.com

恶性肿瘤的发病率和病死率呈逐年上升趋势, 严重威胁着全人类的健康及生命^[1]。转移是导致肿瘤患者病死率高的重要原因, 阻断恶性肿瘤的转移将能显著提高患者生存率。近年来对某一类型肿瘤器官特异性转移(如食管癌转移到肺和肝; 乳腺癌转移到肺、肝、骨等)分子机制的研究受到极大关注。在转移过程中, 肿瘤细胞与靶器官血管内皮细胞的黏附是肿瘤转移的重要步骤, 阻断这种黏附作用有可能抑制肿瘤转移^[2-3]。本课题组在对癌细胞与血管内皮细胞的相关性研究中发现, 不同组织类型肿瘤细胞与不同器官内皮细胞的黏附能力具有明显的组织特异性和选择性, 这种黏附特异性与临床上肿瘤的组织特异性转移密切相关^[4-7]; 并推测, 临床上半数以上的结肠癌发生肝转移可能与结肠癌细胞与人肝窦内皮细胞的嗜性黏附相关。因此, 本研究采用肝窦血管内皮细胞免疫动物, 获得大容量单抗库^[8], 以肝窦内皮细胞和具有肝转移能力的人结肠癌细胞 Ls174T 为研究对象, 通过体外黏附实验, 筛选、鉴定出具有抑制结肠癌细胞与肝窦内皮细胞的黏附功能性单克隆抗体, 并对该单克隆抗体识别的抗原进行了初步鉴定, 为研究结肠癌肝转移的机制, 研制靶向结肠癌肝转移的治疗性抗体奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

人肝窦内皮细胞(human liver sinusoidal endothelial cell, HLSEC)由中日友好医院临床医学研究所娄晋宁教授赠送。小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0-AG14(简称 SP2/0)、结肠癌细胞系 Ls174T(具肝转移能力)为本室保存培养。雌性 6~8 周龄 BALB/c 小鼠购于维通利华生物公司(动物合格证号: SCXK11-00-0010), 饲养于中国协和医科大学实验动物研究所。DMEM、MEM 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为 Hyclone 公司产品。HAT 选择培养液、生物素标记的羊抗鼠 IgM 为 Sigma 公司产品。HRP 标记羊抗小鼠 IgM 为 Vector 公司产品, Cy3 标记 avidin 为 Jackson 公司产品, SBA Clonotyping System/HRP 为 Southern Biotech 公司产品, 明胶(Gelatin)、DAPI 为 Sigma 公司产品。Western blotting 试剂盒购自普利莱基因有限公司。PVDF 为 Millipore 公司产品, 透析管为 GeBA 公司产品。

1.2 细胞培养

HLSECs 细胞培养在 DMEM 培养液中, Ls174T 细胞培养在 MEM 培养液中, SP2/0 细胞和分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞均培养在 DMEM 培养液中。以上培养液中均含有 10% FBS, 筛选杂交瘤细胞时加入 HAT 选择培养液。

1.3 BALB/c 小鼠的免疫及细胞融合

将对数生长期的 HLSECs 注射于 BALB/c 小鼠腹部皮下(共 6 只), 每只小鼠注射 1×10^6 个 HLSECs, 每 2 周 1 次, 连续免疫 12 个月。每隔 2 个月从小鼠尾静脉取血分离血清, 采用固定细胞免疫荧光法测定血清中抗 HLSEC 抗体滴度。当免疫血清抗体滴度不再升高时, 同时测定免疫血清对结肠癌细胞与肝窦内皮细胞黏附的影响。取血清滴度最高并具有抑制结肠癌细胞与肝窦内皮细胞黏附作用的小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 融合细胞接种于甲基纤维素选择性培养皿中。8~10 d 后挑出单个孤立生长的细胞集落转接于 96 孔培养板, 继续培养 7~14 d, 用活细胞荧光测定上清中单抗与 HLSEC 的特异结合能力。

1.4 单克隆抗体亚型的测定及单克隆抗体的纯化

采用 Southern Biotech 生产的单抗分型检测试剂盒, 按照试剂盒说明书进行操作。IgM 抗体采用 Amersham 公司的 Hitrap 预装柱纯化, 纯化后的单抗经 SDS-PAGE 鉴定。

1.5 活细胞免疫荧光法筛选抗肝窦内皮细胞膜抗原的单抗

将肝窦内皮细胞以 1×10^5 /孔接种于 96 孔培养板中, 细胞培养 2 d 后吸弃培养液, 加入抗肝窦内皮细胞的单克隆抗体, 同时设正常小鼠 IgM 作为阴性对照。室温孵育 1 h, 用含 PBS 洗涤, 加入生物素标记羊抗小鼠 IgM(1:400), 室温孵育 30 min, PBS 洗涤, 加入 Cy3-Avidin(1:1 000), 室温孵育 30 min 后, PBS 洗涤; 最后用含 $10 \mu\text{g/ml}$ DAPI 的 50% 甘油覆盖细胞。

1.6 黏附实验测定肿瘤细胞的黏附能力

用 Calcein AM(invitrogen 公司)标记肿瘤细胞。Calcein AM 能够自由穿透细胞膜, 进入细胞后, 被胞质中的脂酶切割释放荧光产物并被保留在胞内, 从而较长时间标记细胞, 而不影响细胞的黏附能力。呈对数生长的结肠癌细胞 Ls174T 用无血清 1640 培养液洗涤, 用 5 mol/L Calcein AM 于 37°C 、5% CO_2 培养标记 30 min。标记的肿瘤细胞经无血清 1640 培养液洗涤后用于黏附试验^[6]。96 孔培养板经 2% 明胶于 37°C 、5% CO_2 培养箱中包被 30 min 后, 将 1×10^4 LSEC 接种于平板, 培养 24 h。经无血清培养液洗涤, 加入稀释好的上述实验中制备的免疫血清或者纯化的功能性单克隆抗体 12B6, 孵育 30 min, 每孔加入含 2.5×10^5 Calcein AM 标记的 Ls174T 结肠癌细胞。于 37°C 、5% CO_2 共同静止孵育 1 h 后, 振荡洗涤 6 次, 洗去未黏附的肿瘤细胞。用荧光显微镜镜检并拍照黏附的肿瘤细胞。每个视野黏附的肿瘤细胞采用 IPP5.1plus 软件计数。

1.7 抗体识别抗原的分离提取

用亲和层析方法提取该单克隆抗体所识别的抗原。将纯化的单克隆抗体 12B6 与 CNBr-activated

Sephamse4B 交联, 将用 Radioimmunoprecipitation (RIPA) 方法提取 HLSEC 细胞的总蛋白溶液与偶联 12B6 的柱料于 4 °C 混合过夜。用 0.1 mol/L 的甘氨酸 (pH 2.5) 洗脱层析柱上的抗原, 将不同管洗脱抗原在真空冷冻浓缩仪上浓缩至 20 μ l, 合并不同管浓缩抗原, 移入到透析管中透析。

1.8 Western blotting 以及 PAGE 胶硝酸银染色检测抗 HLSEC 单抗识别的抗原分子

提取 HLSEC 总蛋白, 用 BCA 方法定量后, 取 30 μ g 蛋白经 SDS-PAGE 分离, 采用半干式电转移法将蛋白从凝胶转移到硝酸纤维素膜 (0.75 mA/cm², 2 h)。丽春红染色确定蛋白转移情况, 并标出标准分子量蛋白的位置。将膜放在 5% 的脱脂奶 (溶于 PBS, pH 7.4) 中 4 °C 封闭过夜, 与杂交瘤上清 37 °C 下孵育 1 h, 以 SP2/0 培养上清作为一抗阴性对照。PBS 清洗后与 HRP 标记羊抗小鼠 IgM (1:200) 37 °C 下孵育 1 h。用 PBST 洗膜 4 次, ECL 发光试剂盒显色。Ag⁺ 能与氨基酸形成稳定的复合物, 然后在还原剂甲醛作用下 Ag⁺ 还原成银颗粒, 蛋白电泳条带可被染成黑褐色, 具体操作按照 Schoenle 等设计的方法进行。

1.9 统计学处理

统计学处理采用 SPSS10.0 软件包, 进行 *t* 检验。统计学显著性水平为 $P < 0.05$, 所有的 *P* 值均为双尾检验。

2 结果

2.1 HLSEC 免疫后动物血清抗体效价变化以及免疫血清的黏附抑制作用

以 1×10^6 个 HLSEC 连续免疫小鼠 10 个月后, 固定细胞免疫荧光法检测每只小鼠血清效价。其中 2 号小鼠效价最高, 达到 1:50 000 (图 1); 再继续免疫 2 个月, 血清的抗体滴度不再显著升高。这时取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 制备了抗 HLSEC 的单克隆抗体库。免疫血清在 1:100 稀释时, 能抑制结肠癌细胞与人肝窦内皮细胞的黏附 (图 2)。

2.2 功能性单抗的成功筛选与鉴定

2.2.1 识别人肝窦内皮细胞膜蛋白单抗的筛选鉴定 免疫融合后提取了 1 440 个单克隆杂交瘤细胞培养于 96 孔板中, 有 1 201 个杂交瘤细胞存活, 其中与 HLSECs 明显反应阳性的有 119 个克隆。图 3 是其中一株单抗 (12B6) 与人 HLSECs 反应的活细胞免疫荧光的结果。

2.2.2 抑制结肠癌细胞与肝窦内皮细胞黏附的功能性单抗筛选 黏附抑制实验结果显示, 抗 HLSEC 单抗能显著抑制结肠癌细胞 Ls174T 与人肝窦内皮细胞的黏附, 抑制率在 30% ~ 51%, 其中 12B6 单抗的抑制作用最强, 抑制率在 50% 以上 (图 4)。

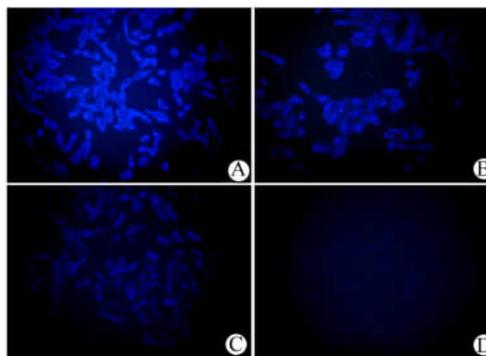


图 1 免疫荧光法检测 2 号小鼠免疫血清效价 ($\times 40$)
Fig. 1 Detection of immune serum titer of 2[#] mouse by immunofluorescence technique ($\times 40$)

A: Immune serum dilution 1:200; B: Immune serum dilution 1:2 000; C: Immune serum dilution 1:50 000; D: Normal mouse serum dilution 1:200

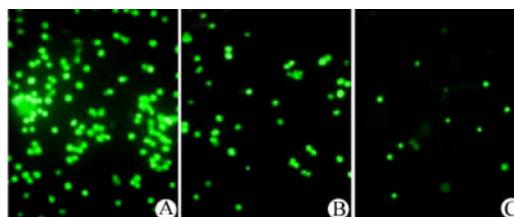


图 2 免疫血清抑制结肠癌细胞 Ls174T 与人肝窦内皮细胞的黏附 ($\times 100$)

Fig. 2 Immune serum inhibited the adhesion between Ls174T and LSECs ($\times 100$)

A: Normal mouse serum (dilution 1:100); B: Immune serum (dilution 1:600); C: Immune serum (dilution 1:100)

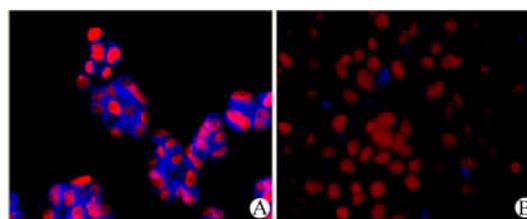


图 3 活细胞免疫荧光检测 12B6 单克隆抗体与人肝窦内皮细胞膜表面抗原蛋白的结合 ($\times 100$)

Fig. 3 Immunofluorescence results of 12B6 monoclonal antibody binding with membrane antigen of HLSECs ($\times 100$)

A: 12B6 monoclonal antibody; B: Control

2.3 单抗的亚型鉴定

在制备的 20 种抗 HLSEC 单克隆抗体中 15 株为 IgM 型 (包括 12B6), 3 株为 IgG 型, 2 株单抗检测不到重链, 没有发现复合类型克隆。

2.4 12B6 抗体对结肠癌细胞与人肝窦内皮细胞黏附的抑制

12B6 杂交瘤细胞大量培养上清用 Hitrap 疏水 (Amersham 公司) 纯化后获取 12B6 单抗, 经 SDS-PAGE 电泳鉴定为单一的抗体条带。将 12B6 进行结肠癌细胞与肝窦内皮细胞黏附的阻断实验, 结果显示该单克隆抗体在 5 ~ 200 μg/ml 范围内能明显抑制 HLSEC 与 Ls174T 之间的黏附 ($P < 0.05$, 图 5)。

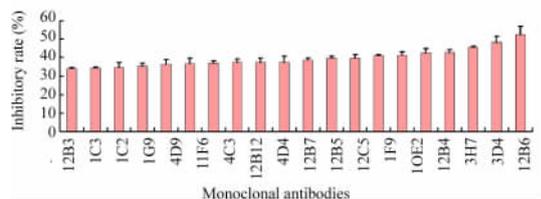


图 4 单克隆抗体对结肠癌细胞 Ls174T 与人肝窦内皮细胞黏附的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effects of monoclonal antibodies against adhesion between Ls174Ts and LSECs

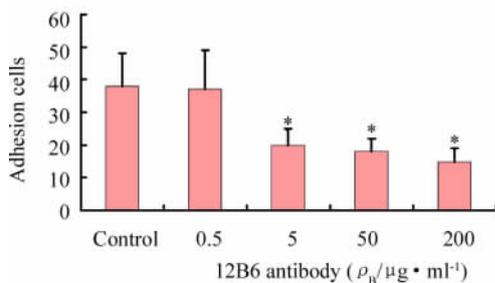


图 5 不同质量浓度纯化抗体 12B6 对结肠癌细胞 Ls174T 与肝窦内皮细胞黏附的抑制作用

Fig. 5 Purified monoclonal antibody 12B6 at different concentrations inhibited adhesion between Ls174T and LSECs

* $P < 0.05$ vs control

2.5 单克隆抗体 12B6 对抗原的特异性识别反应

Western blotting 检测结果显示, 12B6 单抗识别 HLSEC 抗原的相对分子质量约为 46 000。亲和纯化其识别的抗原经 10% SDS-PAGE 电泳后, 经过硝酸银染色, 12B6 单克隆抗体识别的抗原条带位置与 Western blotting 的位置一致(图 6)。

3 讨论

肿瘤转移是一个多步骤的复杂过程, 包括肿瘤细胞从原发灶的脱落、侵入基质、进入脉管系统、在

继发组织器官定位等^[9]。肿瘤的转移有明显的组织器官特异性, 如结肠癌多发生肝转移^[10], 肺癌倾向于脑转移^[11-12]等。尽管肿瘤的组织器官特异性转移可能与解剖学结构和血供有关, 但并不能完全解释其嗜器官转移, 如胃癌与结肠癌的血流相似, 但胃癌最多见的是淋巴结和腹腔转移^[13]。近年来的研究发现, 肿瘤细胞在特定组织器官的转移与靶组织器官内皮细胞的黏附密切相关^[9]; 这种黏附作用包括肿瘤细胞与内皮细胞的瞬时特异性接触黏附^[10], 以及随着肿瘤细胞黏附于靶器官内皮细胞, 两者相互作用导致多种黏附分子的表达, 协同促进肿瘤细胞的器官特异性转移^[14-15]。这些报道表明, 靶器官血管内皮细胞表达的黏附分子在瘤细胞的嗜器官转移中具有重要作用^[16]。若能用特异性抗体封闭这些血管内皮细胞黏附分子, 将有可能阻碍癌细胞在转移靶器官的着床, 从而抑制癌细胞在靶器官的生长、增殖、形成临床可见的远处器官转移灶, 达到预防、治疗肿瘤器官转移的目的。然而到目前为止尚未见到有关人肝窦内皮细胞黏附分子参与人结肠癌肝转移的相关报道。

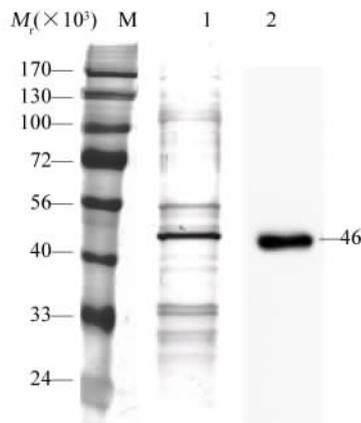


图 6 硝酸银染色以及 Western blotting 检测 12B6 单抗识别的抗原分子

Fig. 6 12B6 recognized antigens as detected by Western blotting assay and silver staining

M: Marker; 1: Silver staining; 2: Western blotting

本研究通过肝窦内皮细胞免疫小鼠获得了抗肝窦内皮细胞的大容量单抗库, 经活细胞荧光染色筛选出能与肝窦内皮细胞反应的杂交瘤细胞 119 株; 进一步通过体外黏附阻断实验筛选出 20 株能抑制 Ls174T 与 HLSEC 黏附的杂交瘤培养上清, 将抑制能力最强的单抗 12B6 纯化后进行黏附阻断实验, 发现该抗体能显著阻断 Ls174T 与 HLSEC 的黏附, 且呈剂量依赖相关性。结果表明该单抗识别的抗原

分子是 Ls174T 细胞黏附 HLSEC 中起重要作用的黏附分子,也可能在结肠癌细胞肝转移中有重要作用。进一步用单抗经亲和层析获得了相应的抗原分子,经 Western blotting 和硝酸银染色证明该抗原分子的相对分子质量约为 46 000,目前正在对抗原分子基因进行鉴定分析,为研究黏附分子在结肠癌肝转移中的作用机制奠定基础。

目前,肿瘤的靶向治疗和针对肿瘤新生血管的单克隆抗体研究越来越受到重视,并且已经取得了重大进展,如识别乳腺癌细胞上 Her-2/neu/ Erb B-2 抗原的 Herceptin 已用于治疗乳腺癌^[17-19];识别 VEGF 的单克隆抗体药 Avastin,通过抑制能够刺激新血管形成的“血管内皮细胞生长因子(VEGF)”治疗大肠癌^[20-21]。本课题筛选获得了 20 株能抑制 Ls174T 细胞与 HLSEC 细胞黏附的功能性单抗。这些单抗在人体内有可能通过封闭人肝窦内皮细胞的相应黏附分子,阻断进入人血流中的结肠癌细胞与肝脏肝窦内皮细胞黏附、滞留和着床,从而减少或阻断结肠癌肝转移灶的形成,具有预防和治疗结肠癌肝转移的潜力。课题组下一步将用这些单抗在动物体内进行治疗结肠癌转移的研究,为研制人源化抗体靶向抗癌药提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Chibana Y, Fujii S, Ichikawa K, *et al.* Tumor cell dissociation score highly correlates with lymph node metastasis in superficial esophageal carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20(9): 1371-1378.
- [3] Beckman M. CAMs are stopping cancer in its metastatic tracks [J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(9): 576-577.
- [4] Chan AO. E-cadherin in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(2): 199-203.
- [5] 周 转, 遇 珑, 冉宇靓. 癌细胞和人血管内皮细胞黏附与器官特异性转移相关[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(21): 1201-1204.
- [6] 遇 珑, 潘 健, 周 转, 等. 抑制食管癌与肺血管内皮黏附的功能性抗体的制备[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(5): 332-337.
- [7] Schlüter K, Gassmann P, Enns A, *et al.* Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential[J]. Am J Pathol, 2006, 169(3): 1064-1073.
- [8] 胡 海, 冉宇靓, 遇 珑, 等. 靶向肿瘤血管内皮细胞抑制人肝癌移植瘤生长的功能性抗体的研制[J]. 癌症, 2007, 26(5): 453-457.
- [9] Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis[J]. Endocr Rev, 2007, 28(3): 297-321.
- [10] Enns A, Gassmann P, Schlüter K, *et al.* Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids [J]. J Gastrointest Surg, 2004, 8(8): 1049-1060.
- [11] Castrucci WA, Knisely JP. An update on the treatment of CNS metastases in small cell lung cancer[J]. Cancer J, 2008, 14(3): 138-146.
- [12] Yano S, Matsumori Y, Ikuta K, *et al.* Current status and perspective of angiogenesis and antivascular therapeutic strategy: non-small cell lung cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(2): 73-81.
- [13] Bai F, Guo X, Yang L, *et al.* Establishment and characterization of a high metastatic potential in the peritoneum for human gastric cancer by orthotopic tumor cell implantation[J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(6): 1571-1578.
- [14] Niu JX, Zhang WJ, Ye LY, *et al.* The role of adhesion molecules, alpha v beta 3, alpha v beta 5 and their ligands in the tumor cell and endothelial cell adhesion[J]. Eur J Cancer Prev, 2007, 16(6): 517-527.
- [15] Yang GY, Xu KS, Pan ZQ, *et al.* Integrin alpha v beta 6 mediates the potential for colon cancer cells to colonize in and metastasize to the liver[J]. Cancer Sci, 2008, 99(5): 879-887.
- [16] Ishizu K, Sunose N, Yamazaki K, *et al.* Development and characterization of a model of liver metastasis using human colon cancer HCT-116 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(9): 1779-1783.
- [17] Huober J, Jackisch C, Untch M, *et al.* Adjuvant therapy with trastuzumab (Herceptin) in primary breast cancer[J]. Zentralbl Gynakol, 2006, 128(1): 30-37.
- [18] Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, *et al.* Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism[J]? Br J Cancer, 2006, 94(2): 259-267.
- [19] Burstein HJ, Keshaviah A, Baron AD, *et al.* Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study[J]. Cancer, 2007, 110(5): 965-972.
- [20] Chu E. Bevacizumab targeted therapy: validation of angiogenesis as a key target for advanced colorectal cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2004, 4(1): 16.
- [21] Ray-Coquard I, Bachelot T, Saba C, *et al.* Are antiangiogenic antibodies universal for solid tumor[J]? Bull Cancer. 2007, 94: S191-S196.

[收稿日期] 2008 - 05 - 15

[修回日期] 2008 - 07 - 12

[本文编辑] 王 莹