

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.04.015

· 基础研究 ·

## 抗 EGFRvⅢ/EGFR 单抗 9B9 的制备和鉴定

高慧萍<sup>△</sup>, 蒋 华<sup>△</sup>, 王华茂, 李宗海<sup>\*</sup>(上海市肿瘤研究所, 上海 200032)

[摘要] 目的: 制备抗 EGFRvⅢ/EGFR 单克隆抗体, 并探讨其对入肝癌细胞株 Huh7-EGFRvⅢ 和表皮癌细胞系 A431 裸鼠移植瘤生长的抑制作用。方法: 将稳转细胞株 3T3-EGFRvⅢ 免疫 BALB/c 小鼠, 免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合, ELISA 法筛选出 EGFRvⅢ 阳性的克隆株并命名为 9B9。Western blotting 和免疫荧光鉴定 9B9 抗体与 EGFRvⅢ/EGFR 抗原结合的特性。建立裸鼠入肝细胞癌和表皮细胞癌移植瘤模型, 分别腹腔注射 PBS、西妥昔单抗和 9B9 抗体, 比较它们对各移植瘤模型的抑瘤效果。结果: 通过杂交瘤制备单克隆抗体技术筛选获得一株单抗 9B9, Western blotting 和免疫荧光结果显示其既能识别 EGFRvⅢ 又能识别 EGFR。9B9 抗体和西妥昔单抗对人肝癌细胞 Huh7-EGFRvⅢ 移植瘤的抑瘤率分别 46% 和 42%, 对人表皮细胞癌移植瘤的抑瘤率分别为 86% 和 85%。结论: 制备获得的单克隆抗体 9B9 可显著抑制裸鼠入肝细胞癌以及表皮细胞癌移植瘤的生长, 具有与西妥昔单抗相似的抑瘤效果。

[关键词] 表皮生长因子受体; 表皮生长因子受体三型突变体; 单克隆抗体; 肝肿瘤; 表皮肿瘤

[中图分类号] R392.11; R735.7; R739.5 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)04-0391-05

## Preparation and identification of a 9B9 monoclonal antibody specifically targeting EGFRvⅢ/EGFR

GAO Hui-ping<sup>△</sup>, JIANG Hua<sup>△</sup>, WANG Hua-mao, LI Zong-hai<sup>\*</sup>(Cancer Institute of Shanghai, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and identify monoclonal antibody specifically targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) and (or) epidermal growth factor receptor variant type III (EGFRvⅢ), and to investigate its inhibitory effects on human hepatocellular carcinoma Huh7-EGFRvⅢ cell- and epidermal carcinoma A431 cell-implanted tumors in nude mice. **Methods:** BALB/c mice were immunized with 3T3 cells stably transfected with EGFRvⅢ (3T3-EGFRvⅢ). Immunized spleen cells were fused with myeloma SP2/0 cells, and anti-EGFRvⅢ monoclonal antibody positive hybridoma cells (named 9B9 antibody and 9B9 cells, respectively) were selected and identified by ELISA. The specific interaction between 9B9 antibody and EGFRvⅢ/EGFR antigen was detected by Western blotting and immunofluorescence assay. Huh7-EGFRvⅢ cell- (human hepatocellular carcinoma Huh7 cells stably transfected with EGFRvⅢ) and epidermal cell carcinoma A431 cell-bearing mouse models were established and were divided into PBS group, Cetuximab group and 9B9 antibody group. Then, anti-tumor effect of 9B9 antibody was examined and compared with those of PBS and Cetuximab. **Results:** A monoclonal antibody, named 9B9 antibody, was obtained by hybridoma technique and it reacted with both EGFRvⅢ antigen and EGFR antigen as detected by Western blotting and immunofluorescence. The inhibitory rates of Cetuximab and 9B9 antibody against Huh7-EGFRvⅢ cells-implanted tumors were 42% and 46%, respectively, and those against A431 cells-implanted tumors were 85% and 86%, respectively. **Conclusion:** 9B9 monoclonal antibody can effectively inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma cell- and epidermal cell carcinoma cell-implanted tumors, and the effects resemble that of Cetuximab.

[Key words] epidermal growth factor receptor (EGFR); epidermal growth factor receptor variant type III (EGFRvⅢ); monoclonal antibody; hepatocellular neoplasms; epidermal neoplasms

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(4): 391-395]

[基金项目] 上海市青年科技启明星(A类)计划资助项目(No. 07QA14046); 国家高技术研究发展计划(863)课题资助项目(No. 2007AA021203); 上海市科委资助项目(No. 06DZ19501)。Supported by the Shanghai Rising Star Foundation for Young Scholar (type A) (No. 07QA14046); the National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2007AA021203); the Science Foundation of Shanghai Scientific Committee (No. 06DZ19501)

[作者简介] 高慧萍(1980-), 女, 山东省德州市人, 硕士, 助理研究员, 主要从事肿瘤生物治疗的研究。蒋 华(1978-), 女, 山东省德州市人, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤抗体研究。<sup>△</sup>并列第一作者

\* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: zonghaili@gmail.com

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是由原癌基因 c-erbB-1 编码的 I 型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体,是相对分子质量为 170 000 的跨膜糖蛋白<sup>[1]</sup>。研究表明,EGFR 在多种肿瘤(如肺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、脑癌、膀胱癌、头颈部肿瘤、卵巢癌、肾癌和前列腺癌)中均存在突变或高表达,与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[2]</sup>。迄今已发现至少有 8 种 EGFR 突变体<sup>[3]</sup>,其中 EGFRv III 型突变体(EGFRv III)是 EGFR 最常见的突变类型。它缺失了 EGFR 的第 2 至第 7 外显子区域,其表达产物具有不依赖配体而自身持续磷酸化的特性。EGFRv III 在正常组织不表达而在很多恶性肿瘤(包括脑胶质瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺鳞癌、前列腺癌等)中呈现高表达,与肿瘤的发生、发展、恶性变、转移以及预后密切相关,EGFRv III 阳性的肿瘤患者预后差,存活期短<sup>[4-7]</sup>。因此,EGFR/EGFRv III 常被作为肿瘤治疗的理想靶点。

目前,针对 EGFR 的靶向性药物主要集中在阻断信号转导的单克隆抗体的研究和开发上,已有多株抗 EGFR/EGFRv III 单抗,如 mAb806<sup>[8]</sup>处于临床 I 期阶段。MDX-447 (Medarex)<sup>[9]</sup>、EMD 72000 (matuzumab)<sup>[10]</sup>和 h-R3<sup>[11]</sup>已进入临床 I/II 期阶段。人鼠嵌合单抗 IMC-C225 (cetuximab)<sup>[13]</sup>及全人源化单抗 ABX-EGF (panitumumab)<sup>[12,14]</sup>已被美国 FDA 批准用于临床治疗头颈癌和结直肠癌<sup>[15-16]</sup>。

本研究旨在制备抗 EGFRv III 和(或)EGFR 的特异性单克隆抗体,并初步研究其对 EGFRv III 阳性表达的肝癌细胞株 Huh7-EGFRv III 和过表达 EGFR 的表皮癌细胞系 A431 裸鼠移植瘤模型的抗肿瘤效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与试剂

人胚肾 HEK 293T 细胞系、小鼠成纤维细胞系 NIH-3T3、皮肤癌细胞系 A431、脑胶质瘤细胞系 U87、肝癌细胞系 Huh-7,以及稳转 EGFRv III 的细胞株 3T3-EGFRv III、U87-EGFRv III、Huh7-EGFRv III 和稳转 EGFR 的细胞株 Huh7-EGFR 由本实验室构建<sup>[17]</sup>。小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0 为本实验室保存培养。新生牛血清(NCS)、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。HAT、DMEM 培养基、PEG 4000、ABTS、鼠单克隆抗体亚型检测试剂盒、羊抗鼠 IgG-FITC、羊抗鼠 IgG-HRP、驴抗羊 IgG-HRP 购自 Sigma 公司。西妥昔单抗(Cetuximab, 100 mg/50 ml)购自德国默克公司。96 孔细胞培养板(Costar, USA)购自上海史瑞可生物科技有限公司。FASC Calibur 流

式细胞仪购自 Becton Dickison 公司产品。BALB/c 小鼠和裸鼠,雌性,4~6 周龄,体重 16~19 g,SPF 环境饲养,由上海市肿瘤研究所实验动物中心提供[实验动物合格证号:SCXK(沪)2007-0001]。

### 1.2 免疫 BALB/c 小鼠和细胞融合

采用本实验室建立的稳转细胞株 3T3-EGFRv III 免疫 5 只 BALB/c 小鼠,每只每次腹部皮下注射  $5 \times 10^6$  个细胞,间隔 2 周,免疫 4 次,第 4 次免疫后 7~10 d 尾静脉取血,ELISA 检测小鼠血清抗 EGFRv III 的抗体效价。效价最高的小鼠采用脾内直接注射  $1 \times 10^6$  个细胞(由 PBS 稀释终体积为 50  $\mu$ l)进行加强免疫,3~4 d 后,小鼠摘眼球放血处死,取脾细胞  $(1 \sim 2) \times 10^8$  与 SP2/0 细胞(脾细胞:SP2/0 为 5:1)在 PEG 4 000 作用下进行融合。融合细胞稀释于 200 ml(含  $1 \times$  HAT、15% FBS、100 U/ml 青霉素和链霉素)的 DMEM 培养液中,以 200  $\mu$ l/孔接种至 10 个 96 孔细胞培养板中,于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  细胞培养箱中培养。

### 1.3 抗 EGFRv III 特异性单克隆抗体的筛选

接种  $3 \times 10^4$ /孔 3T3-EGFRv III 细胞于 10 个 96 孔细胞板,接种相同数量的 NIH-3T3 细胞板作为 ELISA 检测的阴性对照板,细胞在 10% NCS 的 DMEM 培养液培养 12 h 后,10% 甲醇室温固定 1 h,5% PBS 脱脂奶粉 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜。对培养 7 d 的融合细胞上清进行 ELISA 检测。一抗为细胞培养上清 50  $\mu$ l/孔,37  $^{\circ}$ C 温箱孵育 1 h;二抗为 1:2 000 羊抗鼠 IgG-HRP (1 mg/ml):5% PBS 脱脂奶粉,50  $\mu$ l/孔,37  $^{\circ}$ C 温箱孵育 1 h;显色液为 ABTS,37  $^{\circ}$ C 避光显色 15~30 min。以 3T3-EGFRv III 细胞检测阳性、NIH-3T3 细胞检测阴性的克隆定为阳性克隆孔,孔内细胞定为阳性克隆细胞。阳性克隆细胞通过有限稀释法进行重复性的亚克隆,建立稳定的单克隆阳性细胞株 9B9。

### 1.4 腹水的制备及 9B9 抗体的纯化

BALB/c 小鼠腹腔注射 500  $\mu$ l 石蜡/只,4 d 后腹腔接种 9B9 杂交瘤细胞  $1 \times 10^6$ /只,制备腹水 3~5 ml/只,3 000  $\times g$  离心 10 min,弃沉淀,上清采用 HiTrap<sup>TM</sup> protein GHP 预装柱纯化,纯化获得的 9B9 抗体,经 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度。

### 1.5 ELISA 法鉴定 9B9 抗体的亚型

接种  $3 \times 10^4$ /孔 3T3-EGFRv III 细胞于 96 孔细胞板,10% NCS 的 DMEM 培养液培养 12 h 后,10% 甲醇室温固定 1 h,5% PBS 脱脂奶粉 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜。一抗为 1:2 000 纯化 9B9 抗体(2 mg/ml):5% PBS 脱脂奶粉,50  $\mu$ l/孔,37  $^{\circ}$ C 温箱孵育 1 h;二抗为 1:2 000 羊抗鼠 IgG1 IgG2a/IgG2b/IgG3/IgGA/IgGM

(2 mg/ml):5% PBS 脱脂奶粉;三抗为 1:2 000 驴抗羊 IgG-HRP(2 mg/ml):5% PBS 脱脂奶粉, ABTS 显色 15~30 min。

#### 1.6 Western blotting 分析 9B9 抗体识别 EGFRvⅢ 及 EGFR 的特性

分别培养 Huh-7、Huh7-EGFR、Huh7-EGFRvⅢ 及表皮癌细胞系 A431 细胞约  $1 \times 10^6$ , 加 200  $\mu$ l 细胞裂解液(10 mmol/L Tris, 150  $\mu$ mol/L NaCl, 1% NP-40, 10 mmol/L NaF, 2 mmol/L EDTA, 100  $\mu$ g/ml DTT, 100  $\mu$ g/ml PMSF, and 1  $\mu$ g/ml aprotinin)<sup>[18]</sup>, 冰浴裂解 30 min, 4  $^{\circ}$ C, 1 500  $\times$  g 离心 15 min, 弃沉淀, 上清进行蛋白定量后 SDS-PAGE, 并转到 PVDF 膜上。将膜放在 5% PBS 脱脂奶粉中, 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜, 与 9B9 杂交瘤细胞培养上清在 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS-T 清洗后与羊抗鼠 IgG-HRP 的二抗(1:1 000)37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS-T 洗膜 5 次。ECL 发光试剂盒显色。

#### 1.7 免疫荧光实验检测 9B9 抗体与表达 EGFR vⅢ 或 EGFR 细胞的结合

将 U87、U87-EGFR 和 U87-EGFRvⅢ 细胞(约  $5 \times 10^4$  个)分别接种到 24 孔板内的盖玻片上, 含 10% FBS 的 DMEM 培养 12 h, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 5% BSA(溶于 PBS, pH 7.4)37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 加纯化 9B9 抗体(终质量浓度 10  $\mu$ g/ml)室温孵育 30 min, PBS-T 洗涤 3 次, 加羊抗鼠 IgG-FITC(1:50)室温避光孵育 30 min, PBS-T 清洗 3 次, 封片镜检。

#### 1.8 9B9 抗体的体内抑瘤实验

将生长良好的 Huh7-EGFRvⅢ ( $3 \times 10^6$ ) 细胞以及 A431 ( $3 \times 10^6$ ) 细胞, 分别注射于 4~6 周龄 BALB/c 裸鼠左侧肩胛皮下, 肿瘤细胞种植成功后将裸鼠随机各分为 3 组, 每组 7 只, 分别设为 9B9 抗体组、西妥昔单抗组、PBS 对照组, 当瘤体积为 100 mm<sup>3</sup> 时, 9B9 抗体组和西妥昔单抗组分别腹腔注射单抗 0.5 mg/只, 每隔 2 d 注射 1 次, 连续注射 2 周。PBS 对照组以等体积的 PBS 替代, 注射时间和途径相同。3 组分别自注射第 9 天和 15 d 起, 每隔 2 d 测量 1 次肿瘤长短径, 并根据公式  $V = 1/2ab^2$  (a 为长径, b 为短径) 计算肿瘤体积, 得出各组的肿瘤生长曲线。治疗结束后, 将裸鼠引颈处死, 取出肿瘤并称取瘤重, 计算用药后的抑瘤率。

#### 1.9 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并用 Student's *t*-test 分析, 应用 SPSS13.0 软件, 以  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 EGFRvⅢ/EGFR 单克隆抗体的成功制备

通过杂交瘤制备单克隆抗体技术采用接种 3T3-EGFRvⅢ 细胞的 96 孔板进行 ELISA 阳性筛选, 获得一株阳性单克隆细胞株 9B9, 亚型鉴定为 IgG1。

纯化获得的 9B9 抗体经 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度为 99% 以上, 浓度为 2 mg/ml。

### 2.2 9B9 抗体与 EGFRvⅢ/EGFR 抗原结合的特异性

通过 Western blotting 检测 9B9 杂交瘤细胞的培养上清对 Huh-7、Huh7-EGFR、Huh-7-EGFRvⅢ 及 A431 细胞表达的 EGFR 和(或)EGFRvⅢ 识别能力。结果显示, 9B9 抗体与 Huh-7、Huh7-EGFR 和 A431 细胞表达的 EGFR 呈阳性反应, 与 Huh-7-EGFRvⅢ 表达的 EGFRvⅢ 和 EGFR 亦呈阳性反应(图 1)。结果说明单抗 9B9 能与 EGFRvⅢ 特异结合。

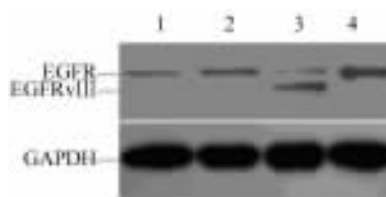


图 1 Western blotting 鉴定 9B9 抗体与 EGFR 和 EGFRvⅢ 抗原的结合

Fig. 1 Identification of interaction between 9B9 antibody with EGFR and EGFRvⅢ antigens by Western blotting

1: Huh-7; 2: Huh7-EGFR; 3: Huh7-EGFRvⅢ; 4: A431

### 2.3 9B9 抗体与表达 EGFR vⅢ/EGFR 的细胞的结合

采用低表达 EGFR 的脑胶质瘤细胞系 U87 和由 EGFR 和 EGFRvⅢ 建立的稳转细胞株 U87-EGFR 和 U87-EGFRvⅢ 通过免疫荧光检测 9B9 抗体与表达 EGFR 和 EGFRvⅢ 的细胞的结合。结果发现 9B9 抗体能够与低表达 EGFR 的 U87、表达 EGFR 的稳转细胞株 U87-EGFR 及表达 EGFRvⅢ 的稳转细胞株 U87-EGFRvⅢ 呈一定的阳性反应(图 2)。

### 2.4 9B9 抗体对肝癌移植瘤生长的抑制

将生长良好的 Huh-7-EGFRvⅢ ( $3 \times 10^6$ ) 细胞注射于 4~6 周龄 BALB/c 裸鼠, 接种细胞后约 5 d, 种植区出现小节结, 成瘤率 100%。第 9 天起测量肿瘤体积, 观察至第 30 天, 绘制生长曲线。PBS 对照组、9B9 抗体组和西妥昔单抗组肿瘤终末体积分别为  $(2291.2 \pm 926)$ 、 $(1604 \pm 557)$  和  $(1370 \pm 793)$  mm<sup>3</sup>, 平均瘤重分别为  $(1.99 \pm 0.42)$ 、 $(1.15 \pm 0.21)$  和  $(1.08 \pm 0.17)$  g。C225 抗体组和 9B9 抗体组的抑瘤率分别为 42% 和 46%。西妥昔单抗组和 9B9 抗体组明显抑制肿瘤生长(图 3,  $P < 0.05$ )。

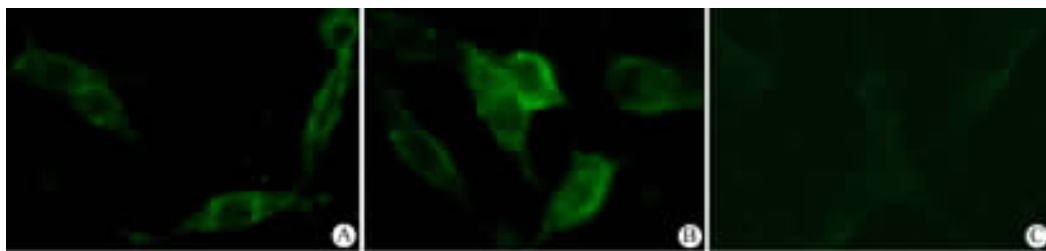


图 2 免疫荧光检测 9B9 抗体与表达 EGFRvIII 或 EGFR 的 U87 细胞的结合( ×400 )

Fig.2 Identification of interaction between 9B9 antibody with U87 cells expressing EGFR or EGFRvIII by immunofluorescence( ×400 )

A: U87-EGFR; B: U87-EGFRvIII ; C: U87

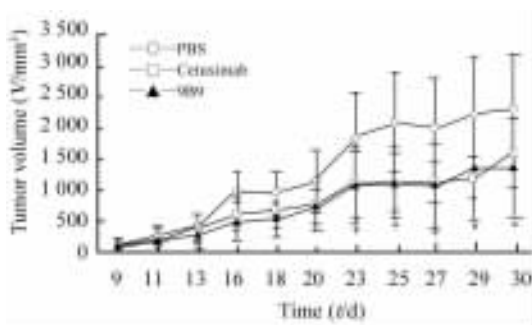


图 3 9B9 抗体抑制裸鼠 Huh7-EGFRvIII 移植瘤的生长

Fig.3 9B9 antibody inhibited growth of Huh7-EGFRvIII implanted tumors in nude mice

\*  $P < 0.05$  vs PBS

### 2.5 9B9 抗体对表皮癌移植瘤生长的抑制

将生长良好的 A431 ( $3 \times 10^6$ ) 细胞注射于 4~6 周龄 BALB/c 裸鼠, 接种 A431 细胞后约 9 d, 种植区出现小节结, 成瘤率 100%。自第 15 天起测量肿瘤体积, 观察至第 56 天, 绘制生长曲线(图 4)。PBS 对照组、西妥昔单抗组和 9B9 抗体组终末体积分别为 ( $917.9 \pm 566.14$ )、( $90.58 \pm 55.74$ ) 和 ( $164.92 \pm 125$ )  $\text{mm}^3$ , 平均瘤重分别为: ( $0.738 \pm 0.15$ )、( $0.108 \pm 0.06$ ) 和 ( $0.105 \pm 0.07$ ) g。西妥昔单抗组和 9B9 抗体组抑制率分别为 85% 和 86%。西妥昔单抗组和 9B9 抗体组分别与 PBS 对照组相比能显著抑制肿瘤生长 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

EGFR 是 Her/ErbB 家族的一个酪氨酸激酶生长因子受体, 通过与配体结合后在细胞膜表面与其自身形成同源二聚体或与家族其他成员形成异源二聚体, 内在蛋白磷酸化, 从而活化酪氨酸激酶, 进而激活下游的信号通路, 介导细胞的分化、生存、迁移、

侵袭和细胞损伤和修复等生命活动。EGFRvIII 具有不依赖配体自身磷酸化及自身激活酪氨酸激酶的特性, 从而激活下游的信号通路, 刺激细胞的增殖效应。故阻断信号转导是靶向 EGFR/EGFRvIII 药物开发的一个重要思路。目前已有多种抗体进入临床试验阶段<sup>[15-16]</sup>。IMC-C225(cetuximab) 是 2004 年被 FDA 批准上市的一株新型抗 EGFR 人鼠嵌合单克隆抗体<sup>[19]</sup>, 研究表明 IMC-C225 作用机制复杂。其中, IMC-C225 与 EGFR 竞争性结合后, 抗体-受体复合物内化进入细胞内, 从而造成 EGFR 的下调, 进而抑制受体介导的多种生物学活动已被证实<sup>[20]</sup>。

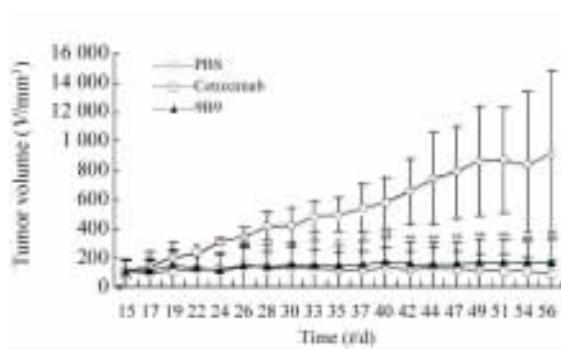


图 4 9B9 抗体抑制裸鼠 A431 移植瘤的生长

Fig.4 9B9 antibody inhibited growth of A431 implanted tumors in nude mice

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs PBS

本研究通过杂交瘤单克隆抗体制备技术由 3T3-EGFRvIII 筛选获得一株单抗 9B9, Western blotting 结果显示了 9B9 抗体不仅能识别稳转细胞株 Huh7-EGFRvIII 表达的 EGFRvIII, 又能识别野生型 Huh-7 及稳转细胞株 Huh7-EGFR 表达的 EGFR。免疫荧光实验(图 2)亦进一步证明了 9B9 抗体能够与 EGFRvIII/EGFR 结合的特性。

为进一步鉴定 9B9 抗体对裸鼠移植瘤生长的抑制效果,采用 Huh7-EGFRv III 细胞株和表皮癌细胞系 A431 建立裸鼠移植瘤模型,探讨 9B9 抗体对表达 EGFRv III 及表达 EGFR 的裸鼠移植瘤的抑瘤效果。结果显示 9B9 抗体和西妥昔单抗对 Huh-7-EGFRv III 细胞移植瘤的抑瘤率分别为 46% 和 42%,表明 9B9 对同时表达 EGFR 和 EGFRv III 的 Huh-7 肝细胞肿瘤的有一定的抑制效果,与 Huether 等<sup>[21]</sup>研究的 IMC-C225 具有相似的效果。A431 移植瘤实验中显示,9B9 抗体和西妥昔单抗的抑瘤率分别是 86% 和 85%。表明 9B9 抗体对过表达 EGFR 的表皮癌肿瘤具有显著的抑制效果。提示 9B9 抗体可能对高表达 EGFR 肿瘤的抑制效果较表达 EGFRv III 的肿瘤抑制效果显著,故 9B9 抗体可能有望用于治疗高表达 EGFR 的各种肿瘤治疗中。另外,两组裸鼠移植瘤实验结果都显示了 9B9 与西妥昔单抗具有相当的抑瘤效果,并且两者都是 IgG1 亚型,提示 9B9 抗体可能与西妥昔单抗具有相似的作用机制和良好的应用前景。本研究为进一步探讨 9B9 抗体对其他肿瘤生长的抑制作用及更深入的探讨其作用机制提供依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, *et al.* Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells [ J ]. *Nature*, 1984, 309( 5967 ): 418-425.
- [ 2 ] Modjtahedi H, Dean C. The receptor for EGF and its ligands expression, prognostic value and target for therapy in cancer [ J ]. *Int J Oncol*, 1994, 4( 1 ): 277-296.
- [ 3 ] Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor v III as a molecular target in cancer therapy [ J ]. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8( 2 ): 83-96.
- [ 4 ] Diedrich U, Lucius J, Baron E, *et al.* Distribution of epidermal growth factor receptor gene amplification in brain tumours and correlation to prognosis [ J ]. *J Neurol*, 1995, 242( 10 ): 683-688.
- [ 5 ] Feldkamp MM, Lala P, Lau N, *et al.* Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens [ J ]. *Neurosurgery*, 1999, 45( 6 ): 1442-1453.
- [ 6 ] Pedersen NW, Meltorn M, Damstrup L, *et al.* The type III epidermal growth factor receptor mutation [ J ]. *Ann Oncol*, 2001, 12( 6 ): 745-760.
- [ 7 ] Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy [ J ]. *Oncologist*, 2002, 7( 4 ): 2-8.
- [ 8 ] Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, *et al.* A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104( 10 ): 4071-4076.
- [ 9 ] Fury MG, Lipton A, Smith KM, *et al.* A phase-I trial of the epidermal growth factor directed bipecific antibody MDX-447 without and with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in patients with advanced solid tumors [ J ]. *Cancer Immunol Immun*, 2008, 57( 2 ): 155-163.
- [ 10 ] Ou C, Wu FX, Luo Y, *et al.* Expression and significance of epidermal growth factor receptor variant type III in hepatocellular carcinoma [ J ]. *J Chin Cancer*, 2005, 24( 2 ): 166-169.
- [ 11 ] Bode U, Buchen S, Janssen G, *et al.* Results of a phase II trial of h-R3 monoclonal antibody ( nimotuzumab ) in the treatment of resistant or relaped high-grade gliomas in children and asolecents [ J ]. *J Clin Oncol*, 2006, 24( 18S ): 1522-1528.
- [ 12 ] Peeters M, Cutserm VE, Siena S, *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2007, 25( 13 ): 1658-1664.
- [ 13 ] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous cell carcinoma of the head and neck [ J ]. *N Engl J Med*, 2006, 354( 6 ): 567-578.
- [ 14 ] Food KA, Yang XD, Weiner LM, *et al.* Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody [ J ]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58( 3 ): 984-990.
- [ 15 ] Rocha-Lima CM, Soares HP, Racz LE, *et al.* EGFR targeting of solid tumors [ J ]. *Cancer Control*, 2007, 14( 3 ): 295-304.
- [ 16 ] Overman MJ, Hoff PM. EGFR-targeting therapies in colorectal cancer [ J ]. *Dis Colon Rectum*, 2007, 50( 8 ): 1259-1270.
- [ 17 ] Wang HM, Jiang H, Li ZH, *et al.* Epidermal growth factor receptor v III enhances tumorigenicity and resistance to 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma [ J ]. *Cancer Lett*, 2009, 279( 1 ): 30-38.
- [ 18 ] Liu CM, Liu DP, Dong WJ, *et al.* Retrovirus vector-mediated stable gene silencing in human cell [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313( 3 ): 716-720.
- [ 19 ] Burtneß B. The role of cetuximab in the treatment of squamous cell of head and neck [ J ]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5( 8 ): 1085-1093.
- [ 20 ] Harding J, Burtneß B. Cetuximab: an epidermal growth factor chemic human-murine monoclonal antibody [ J ]. *Drugs Today ( Barc )*, 2005, 41( 2 ): 107-127.
- [ 21 ] Huether A, Hopfner M, Baradari V, *et al.* EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer [ J ]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70( 11 ): 1568-1578.

[ 收稿日期 ] 2009-02-27

[ 修回日期 ] 2009-06-15

[ 本文编辑 ] 韩丹