

曲妥珠单抗对 SW-620 人结肠癌细胞增殖 凋亡的影响及其与奥沙利铂协同作用的研究



王建¹, 安华松¹, 宋正霞², 何跃君¹, 郭贞¹

1. 徐州矿务集团总医院普通外科(江苏徐州 221006)

2. 徐州矿务集团总医院感染性疾病科(江苏徐州 221006)

【摘要】 目的 观察不同浓度曲妥珠单抗单独或联合奥沙利铂对 SW-620 人结肠癌细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响,并探讨其作用机制。方法 体外培养 SW-620 人结肠癌细胞。① 细胞增殖实验:将细胞分为 2 个大组:曲妥珠单抗组和曲妥珠单抗+奥沙利铂组,每个大组内设 8 个浓度小组(每个小组设 5 个复孔),曲妥珠单抗组的浓度依次为 0、0.001、0.01、0.1、1、10、100 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对应的曲妥珠单抗+奥沙利铂组曲妥珠单抗的浓度与前相同,不同之处在于均加入了奥沙利铂(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。采用 CCK-8 法检测各组细胞的吸光度(OD)值。② 细胞凋亡实验:组别设置同增殖实验,只是曲妥珠单抗的浓度仅包括 0、0.1、1 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用流式细胞仪检测各组细胞的细胞凋亡率及细胞周期分布。③ her-2 蛋白表达检测:分别以 0、100 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗,以及 0、1 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗联合奥沙利铂(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)处理 SW-620 细胞,采用 Western blot 法检测各细胞中 her-2 蛋白的表达。结果 ① 细胞增殖实验:同种浓度下曲妥珠单抗+奥沙利铂组的 OD 值均低于曲妥珠单抗组($P<0.05$),且随着曲妥珠单抗浓度的增加,OD 值在逐渐降低。② 细胞凋亡实验:同种曲妥珠单抗浓度下,曲妥珠单抗组+奥沙利铂组的细胞凋亡率均较曲妥珠单抗组高($P<0.05$)。流式细胞检测:不同浓度曲妥珠单抗+奥沙利铂处理后,随浓度增加, G_1 期细胞比例呈下降趋势, S 期细胞比例呈上升趋势,且呈剂量依赖性;至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时比较,前者的 G_1 期细胞比例较低, S 期细胞比例较高($P<0.05$);在 0.1、1 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的曲妥珠单抗条件下,曲妥珠单抗联合奥沙利铂组的 G_2 期细胞比例较曲妥珠单抗单药组升高($P<0.01$)。③ her-2 蛋白的表达水平:1、100 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗组细胞中 her-2 蛋白的表达水平逐渐降低,3 组间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$);0、1 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗+奥沙利铂组中 her-2 蛋白的表达水平也逐渐降低,3 组间两两比较差异也有统计学意义($P<0.05$)。结论 高浓度曲妥珠单抗可抑制 SW620 人结肠癌细胞的增殖,诱导其凋亡。曲妥珠单抗和奥沙利铂具有协同抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。

【关键词】 结肠癌;曲妥珠单抗;奥沙利铂;her-2 蛋白;SW-620 细胞;体外实验

Effect of trastuzumab on proliferation and apoptosis of SW-620 human colon cancer cell and its synergistic effect with oxaliplatin

WANG Jian¹, AN Huasong¹, SONG Zhengxia², HE Yuejun¹, GUO Zhen¹

1. Department of General Surgery, Xuzhou Mining Group General Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221006, P. R. China

2. Department of Infectious Disease, Xuzhou Mining Group General Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221006, P. R. China

Corresponding author: WANG Jian, Email: 15005206620@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of different concentrations of trastuzumab alone or in combination with oxaliplatin on proliferation, apoptosis, and cell cycle of SW-620 human colon cancer cell, and to explore its mechanism. **Methods** SW-620 human colon cancer cell were cultured *in vitro*. ① Cell proliferation experiment: the cells were divided into two large groups: trastuzumab group and trastuzumab combined with oxaliplatin group. There were 8 concentration groups in each large group (5 holes for each group). The concentration of the trastuzumab group was 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, corresponding to the trastuzumab combined with oxaliplatin group. The concentration of the antibiotic was the same as before, except that oxaliplatin (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) was added. The

DOI: 10.7507/1007-9424.201808044

基金项目:徐州市科技计划项目(项目编号:KC16SL146)

通信作者:王建, Email: 15005206620@163.com

absorbance (OD) value of each group of cells was measured by CCK-8 method. ② Apoptosis experiment: the same proliferation experiment was performed in the group, except that the concentration of trastuzumab only included concentrations of 0, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Flow cytometry was used to detect the proportion of apoptotic cells and cell cycle distribution in each group. ③ Determination of her-2 protein. The SW-620 cells were divided into 2 large groups, the concentration of trastuzumab group conclude 0, 100, and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as well as the concentration of trastuzumab in trastuzumab combined with oxaliplatin group conclude 0, 1, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Expressions of her-2 protein in SW-620 cells were detected by Western blot method. **Results** ① Cell proliferation assay: the OD values at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were significantly lower than those at 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$). At the same concentration, the OD value of the trastuzumab combined with oxaliplatin group was lower than that of the trastuzumab group ($P < 0.05$), and the OD value gradually decreased with the increase of the concentration of trastuzumab. ② Apoptosis experiment: the proportion of apoptotic cells in the trastuzumab group combined with oxaliplatin group was higher than that in the trastuzumab group ($P < 0.05$). Flow cytometry: after treatment with different concentrations of trastuzumab combined with oxaliplatin, cells in G_1 phase showed a downward trend, and cells in S phase showed an upward trend in a dose-dependent manner. At 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration of trastuzumab, the trastuzumab plus oxaliplatin group significantly reduced the proportion of cells in the G_1 phase of SW-620 cell cycle compared with the trastuzumab monotherapy group ($P < 0.05$). The proportion of G_2 phase cells was significantly higher in trastuzumab combined with oxaliplatin group than trastuzumab monotherapy group at 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations of trastuzumab ($P < 0.01$). ③ Expressions of her-2 protein: the expression level of her-2 protein gradually decreased at 1, 100, and 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trastuzumab group ($P < 0.05$). The expression levels of her-2 protein in 0, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trastuzumab combined with oxaliplatin group also gradually decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** High concentration of trastuzumab can inhibit the proliferation of SW-620 human colon cancer cells and induce apoptosis. Trastuzumab combined with oxaliplatin have synergistic effects on inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis.

【Keywords】 colon cancer; trastuzumab; oxaliplatin; her-2 protein; SW-620 cell; experiment *in vitro*

结肠癌 (colon cancer) 是一种发病率为 9.7% 的异质性疾病, 为世界第 3 大常见肿瘤, 患者死亡率排名第 4^[1]。预计从 2012 年至 2035 年, 每年新发的结肠癌患者数量可从 140 万增至 240 万^[2], 有 90% ~ 95% 的结肠癌患者是由基因突变演变所导致的。除了手术治疗, 大多数结肠癌患者采用放疗和化疗治疗, 然而效果欠佳。截止目前 (2018 年), 在与肿瘤发生有关的多种生物标志物中, 许多研究显示这些生物标志物与预后相关, 说明这些肿瘤标志物在促进肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用^[3]。由于基因突变、基因扩增或蛋白过表达等原因, 人表皮生长因子家族可表达在一些特定的肿瘤组织中, 如结肠癌。人表皮生长因子受体 (her) 家族成员包括 her-1、her-2、her-3 及 her-4。人表皮生长因子可通过促进酪氨酸激酶受体介导的信号通路, 从而发挥促进细胞增殖作用^[4-5]。许多研究证实, her-2 蛋白过表达促进了肿瘤的发生发展过程^[6-9]。针对 her-2 基因的靶向药物曲妥珠单抗 (herceptin) 已经广泛应用于乳腺癌和胃癌的治疗, 但对于结肠癌的治疗效果尚未明确。本实验将曲妥珠单抗应用于 SW-620 细胞, 观察其对细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响, 并探讨了曲妥珠单抗联合奥沙利铂 (oxaliplatin) 的协同作用情况, 以明确其在临床作

为手术、化疗和放疗的辅助治疗上的应用前景。

1 材料和方法

1.1 实验材料、主要试剂及设备

人结肠癌细胞株 SW-620 购自上海细胞生物研究所细胞库; DMEM 培养基和胎牛血清均购自美国 Hyclone 公司; 细胞计数试剂盒 (CCK-8 试剂盒) 购自日本同仁化学研究所; 流式凋亡检测试剂盒和膜联蛋白-V/碘化丙啶 (Annexin-V/PI) 购自杭州联科生物科技有限公司; 蛋白提取试剂盒购自北京宝杰罗生物科技有限公司; 曲妥珠单抗购自罗氏制药公司; 奥沙利铂购自江苏奥赛康药业有限公司。流式细胞仪 (型号 BD FACS Calibur) 系美国 BD 公司产品。

1.2 细胞培养

人结肠癌细胞株 SW-620 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 条件下常规培养。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖

取对数生长期的 SW-620 细胞制成单细胞悬液并计数细胞密度。之后细胞的分组分为 2 个板块。① 将细胞分 8 个浓度小组 (每个小组设 5 个复孔), 曲妥珠单抗组的浓度依次为 0、0.001、0.01、

0.1、1、10、100 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。② 将细胞分为 2 个大组：曲妥珠单抗组和曲妥珠单抗+奥沙利铂组，每个大组内设 8 个浓度小组（每个小组设 5 个复孔），曲妥珠单抗组的浓度依次为 0、0.001、0.01、0.1、1 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，对应的曲妥珠单抗+奥沙利铂组的曲妥珠单抗的浓度与前相同，不同之处在于均加入了奥沙利铂（10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）。在 96 孔板每孔加入 200 μL 细胞悬液（5 000 个细胞），分别加入上述浓度的曲妥珠单抗及奥沙利铂。同时设置培养液对照孔以用于整块培养板的调零。在细胞培养箱内孵育 48 h 后，每孔加入 CCK-8 溶液 20 μL ，在细胞培养箱内继续孵育 4 h。在 450 nm 处测定吸光度（OD）值，根据 OD 值比较各组细胞的增殖能力。

1.4 流式细胞术检测细胞的凋亡

取对数生长期的 SW-620 细胞制成单细胞悬液并计数，操作同上。组别设置同上，由于实验经费与时间有限，曲妥珠单抗的浓度进取 0、0.1、1 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。于 24 孔板中每孔加入 1×10^5 个细胞，给予相应的处理，在细胞培养箱内孵育 48 h 后，使用不含乙二胺四乙酸（EDTA）的胰酶消化收集贴壁细胞，以 1 200 r/min 的转速离心 5 min 收集细胞（ $r=7$ cm）。使用凋亡试剂盒进行避光染色，在 1 h 内上流式细胞仪进行检测。结果判断：活细胞，Annexin-V（-）/PI（-）；早期凋亡细胞，Annexin-V（+）/PI（-）；晚期凋亡细胞，Annexin-V（+）/PI（+）。细胞总凋亡比例=早期凋亡细胞比例+晚期凋亡细胞比例^[10-11]。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

细胞处理及分组同 1.4，但曲妥珠单抗的浓度仅包括低浓度，即 0、0.1、1 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。各组细胞在细胞培养箱内孵育 48 h 后，收集细胞，加入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75% 乙醇中，4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜；用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次；加入 100 μL PBS 液重悬细胞，再加入 0.5% 碘化丙啶（PI）5 μL ，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min；使用流式细胞仪进行细胞周期检测。

1.6 Western blot 法检测各组 SW-620 细胞中 her-2 蛋白的表达

根据前述研究结果，分别以 0、100 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗，以及 0、1 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曲妥珠单抗联合奥沙利铂（10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）处理 SW-620 细胞后，按照蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白，一抗加入 her-2 抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜 3 次，每次 5 min，然后跟辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG（二抗）室温孵育 2 h，洗膜 3 次，每次 5 min，最后在暗室中显影。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）作为内

参对照。利用 Image J 软件进行灰度分析：her-2 蛋白的相对表达水平以目的蛋白与对应的内参蛋白的灰度值的比值表示。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析，计量资料以采用 Shapiro-Wilk 检验行正态分布检验，符合正态分布者以均数 \pm 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，否则以中位数表示。采用 Levene 检验行方差齐性检验。多组间比较采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 曲妥珠单抗对 SW-620 细胞增殖的影响

CCK-8 细胞增殖实验结果表明，曲妥珠单抗对 SW-620 细胞的增殖具有抑制作用，但是低浓度时作用较微弱，只有在高浓度（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）时才具有显著的抑制作用，即在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下的 OD 值与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见图 1a。曲妥珠单抗联合奥沙利铂对 SW-620 细胞的抑制作用明显增强，同种曲妥珠单抗浓度下曲妥珠单抗+奥沙利铂组的 OD 值均低于曲妥珠单抗组（ $P<0.05$ ），且在曲妥珠单抗+奥沙利铂组中，随着曲妥珠单抗浓度的增加，OD 值在逐渐降低，具有剂量依赖性（图 1b），表明曲妥珠单抗和奥沙利铂协同抑制细胞的增殖。

2.2 曲妥珠单抗对 SW-620 细胞凋亡的影响

细胞凋亡实验表明，同种曲妥珠单抗浓度下，曲妥珠单抗组+奥沙利铂组的凋亡细胞比例均较曲妥珠单抗组高（ $P<0.05$ ）。在曲妥珠单抗组中，总体而言随曲妥珠单抗浓度增加，凋亡细胞比例增加，但仅在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，凋亡细胞比例与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较差异才有统计学意义（ $P<0.05$ ）；在曲妥珠单抗+奥沙利铂组中，总体而言随曲妥珠单抗浓度增加，凋亡细胞比例也逐渐增加，在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，细胞凋亡率与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）。该结果提示，曲妥珠单抗对 SW-620 细胞的凋亡具有促进作用；曲妥珠单抗和奥沙利铂具有协同抗凋亡的作用，且呈剂量依赖性，具体见图 2。

2.3 曲妥珠单抗对 SW-620 细胞周期的影响

细胞周期实验表明，不同浓度的曲妥珠单抗处理 SW-620 细胞后，4 种浓度组细胞的 G_1 、S 及 G_2 期细胞比例比较差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）；但是不同浓度的曲妥珠单抗+奥沙利铂处理后，随曲妥珠单抗浓度的增加， G_1 期细胞比例呈下降趋

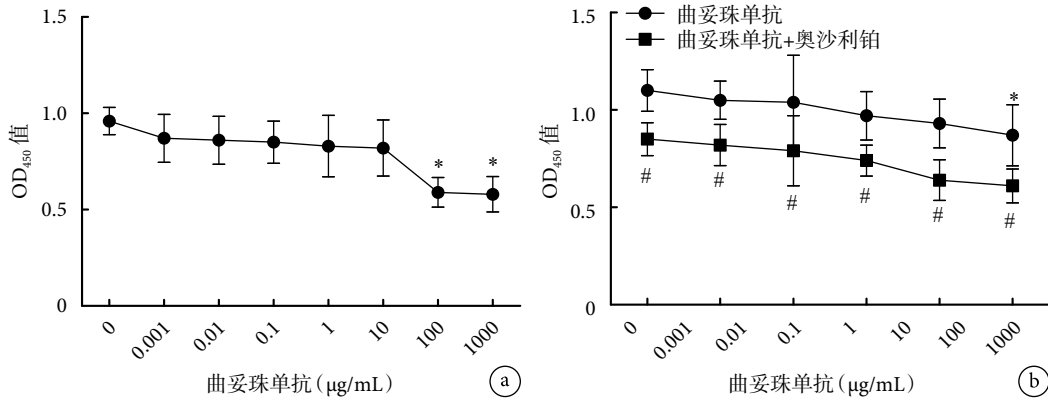


图 1 示不同浓度曲妥珠单抗单独或者联合奥沙利铂组 SW-620 细胞的 OD 值

a: 不同浓度曲妥珠单抗组细胞的 OD 值, 与 0 μg/mL 比较, *P<0.05; b: 同浓度曲妥珠单抗联合奥沙利铂细胞的 OD 值, 与同等浓度曲妥珠单抗组比较, #P<0.05

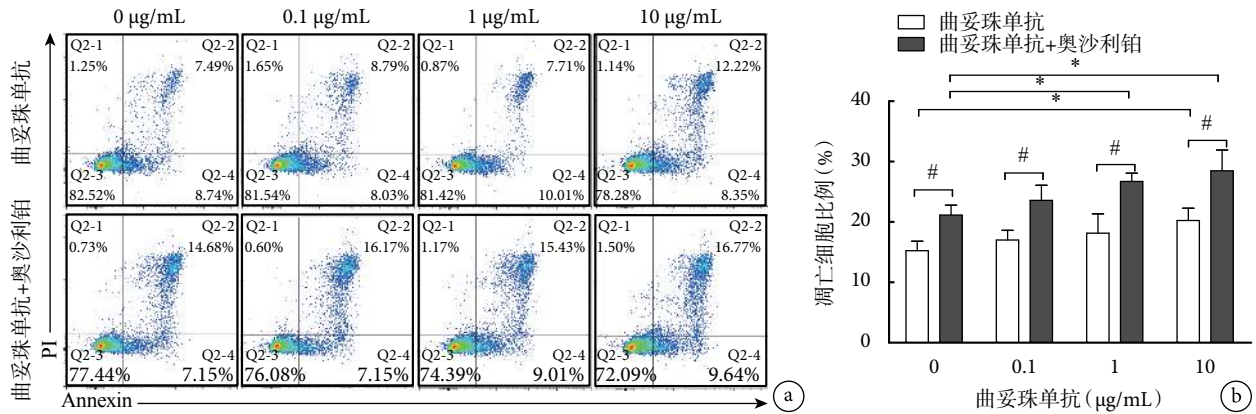


图 2 示不同浓度曲妥珠单抗单独或者联合奥沙利铂组 SW-620 细胞的凋亡率

a: 示不同浓度曲妥珠单抗单独或者联合奥沙利铂组 SW-620 细胞凋亡的流式细胞仪检测结果; b: 不同浓度曲妥珠单抗单独或者联合奥沙利铂组的细胞凋亡率结果, *和#表示 P<0.05

势, S 期细胞比例呈上升趋势, 且呈剂量依赖性, 1 μg/mL 和 10 μg/mL 时的 G₁ 期细胞比例和 S 期细胞比例与 0 μg/mL 比较, 差异均有统计学意义 (P<0.05), 前者的 G₁ 期细胞比例较高, 而 S 期细胞比例较低 (图 3a)。在 1 μg/mL 和 10 μg/mL 浓度曲妥珠单抗条件下, 曲妥珠单抗联合奥沙利铂组的 G₁ 期细胞比例较曲妥珠单抗单药组低, 而 S 期细胞比例较高 (P<0.05); 在 0.1、1 和 10 μg/mL 浓度的曲妥珠单抗条件下, 曲妥珠单抗联合奥沙利铂组的 G₂ 期细胞比例较曲妥珠单抗单药组升高 (P<0.01)。具体见图 3。该结果表明, 曲妥珠单抗和奥沙利铂具有协同抑制细胞周期的作用。

2.4 Western blot 检测 SW-620 细胞中 her-2 蛋白的表达

Western blot 结果显示, 1、100 及 1000 μg/mL 曲妥珠单抗组细胞中 her-2 蛋白的表达水平逐渐降低, 3 组间两两比较差异均有统计学意义 (P<0.05);

0、1 及 10 μg/mL 曲妥珠单抗+奥沙利铂组中 her-2 蛋白的表达水平也逐渐降低, 3 组间两两比较差异也有统计学意义 (P<0.05)。具体见图 4。

3 讨论

生物治疗是现今肿瘤肿瘤的一个热门研究方向。随着生物学的深入发展, 人们发现, 编码生长因子及其受体的原癌基因在一些人类恶性肿瘤的发生和发展中起着重要作用^[12-13], 抑制这些生长因子及其受体的功能是目前肿瘤综合治疗的一个新策略。有研究^[14]发现, HER-2/neu 基因的扩增在许多恶性肿瘤中出现不同程度的表达, 尤其是上皮源性的肿瘤, 如乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌等^[15]。Liang 等^[16]以聚合酶链反应片段长度来研究 Her-2/neu 基因多态性在密码子 655 上的分布及其与中国人结肠癌易感性的关系, 发现异亮氨酸+缬氨酸/缬氨酸基因和缬氨酸等位基因 (25.34%

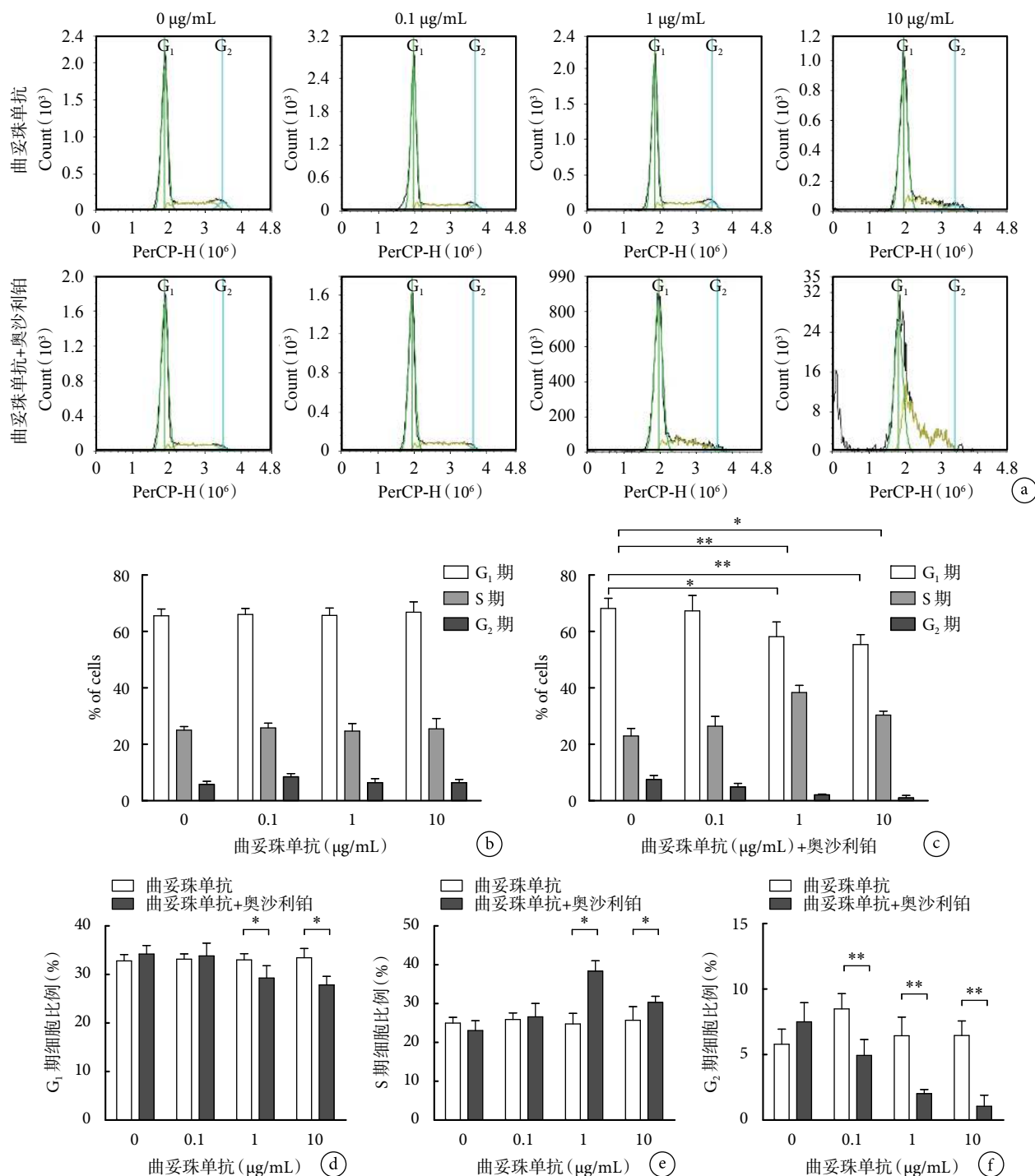


图 3 示不同浓度曲妥珠单抗单独或联合奥沙利铂对 SW-620 细胞周期的影响

a: 不同浓度曲妥珠单抗单独或联合奥沙利铂组细胞周期的流式细胞仪检测结果; b 和 c: 不同浓度曲妥珠单抗组 (b) 和不同浓度曲妥珠单抗+奥沙利铂组 (c) 的细胞周期结果; d-f: 不同浓度曲妥珠单抗组和不同浓度曲妥珠单抗+奥沙利铂组的 G₁ 期 (d)、S 期 (e) 和 G₂ 期 (f) 细胞占比比较; *表示 P<0.05, **表示 P<0.01

和 13.36%) 均与结肠癌的发生有关。近年来, 有关 her-2 蛋白的过度表达与结肠癌生物行为关系的研究日益增多, 虽未达成统一的意见, 但普遍认为, 有 10% ~ 47% 的结肠癌存在 her-2 蛋白的过表达^[2,17]。有研究^[18]表明, Her-2 蛋白的表达水平不仅与 Dukes 分期和生存期有关, 还与肿瘤的分化程度

及是否有淋巴结转移有关, 可以作为结肠癌独立的预后因素。曲妥珠单抗就是针对 her-2 蛋白设计的人源化鼠嵌合型抗体, 是一种新型、高效、低毒及选择性强的靶向治疗药物, 1988 年被美国 FDA 批准上市, 已通过 III 期临床试验, 取得了令人鼓舞的疗效^[19]。单用曲妥珠单抗或者与多种化疗药物如顺

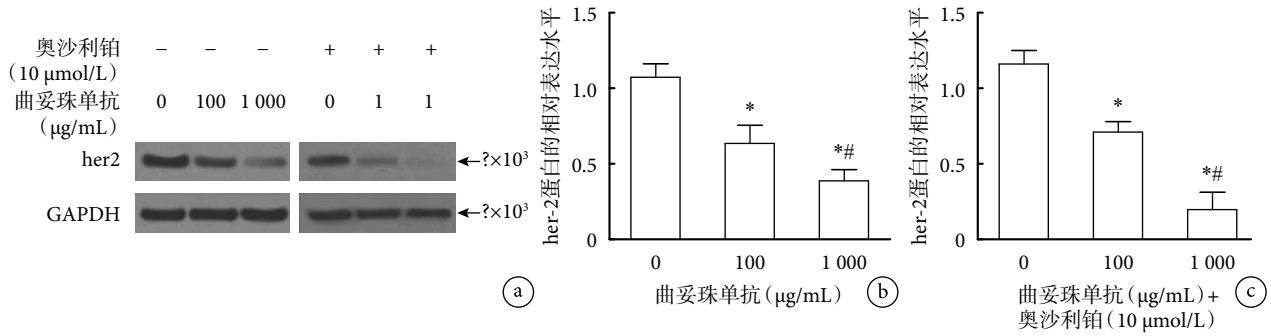


图4 示不同浓度曲妥珠单抗单独或联合奥沙利铂组 SW-620 细胞中 her-2 蛋白的表达

a: her-2 蛋白表达的电泳图; b: 不用浓度曲妥珠单抗组 SW-620 细胞中 her-2 蛋白的相对表达水平, 与 0 μg/mL 组比较, *P<0.05, 与 100 μg/mL 组比较, #P<0.05; c: 不用浓度曲妥珠单抗联合奥沙利铂组 SW-620 细胞中 her-2 蛋白的相对表达水平, 与 0 μg/mL 组比较, *P<0.05, 与 1 μg/mL 组比较, #P<0.05

铂、奥沙利铂等联合应用, 具有良好的协同效应及相加作用^[20-21], 优于单药, 且不增加化疗的毒性^[22]。

曲妥珠单抗主要用于乳腺癌的治疗, 目前国内对曲妥珠单抗对结肠癌细胞的作用研究较少。研究^[23]认为, Her-2/neu 基因过表达可使内皮细胞收缩, 细胞间隙增宽, 肿瘤细胞易于从内皮细胞间穿越, 肿瘤细胞发生移位或转移。本实验的 Western blot 结果显示, SW-620 结肠癌细胞中 her-2 蛋白的表达呈阳性; 高浓度 (100 μg/mL 和 1 000 μg/mL) 曲妥珠单抗较对 SW-620 细胞增殖的抑制作用较 0 μg/mL 浓度显著; 曲妥珠单抗联合奥沙利铂后, 随着曲妥珠单抗药物浓度的增加, 对 SW-620 增殖的抑制作用逐渐增强。研究表明, her-2 蛋白过表达细胞表现出对 TNF 处理的敏感性, 这一结果提示 Her-2 过表达可以通过诱导肿瘤细胞对宿主抗肿瘤机制的耐受而促进肿瘤的发生^[24]。曲妥珠单抗可以增强免疫细胞攻击作用, 促进杀伤肿瘤靶细胞及促进其凋亡^[25]。流式细胞术结果显示, 10 μg/mL 曲妥珠单抗组的 SW-620 凋亡细胞比例较 0 μg/mL 曲妥珠单抗组高; 曲妥珠单抗联合奥沙利铂后, SW-620 细胞凋亡率随曲妥珠单抗的药物浓度增加而呈逐渐增高趋势。流式细胞术结果还表明, 不同浓度曲妥珠单抗组间的各细胞周期比例比较差异均无统计学意义, 曲妥珠单抗联合奥沙利铂后, 随着曲妥珠单抗药物浓度的升高, SW-620 人结肠癌细胞中 G1 期的比例呈逐渐降低, G2 期细胞比例呈逐渐增高, 表明曲妥珠单抗和奥沙利铂具有协同抑制细胞周期的作用。

本实验 her-2 蛋白表达检测结果显示: 实验中, 高浓度 (100 μg/mL 和 1 000 μg/mL) 曲妥珠单抗能显著抑制 her-2 蛋白的表达水平, 表明曲妥珠单抗可能通过下调 her-2 蛋白的表达来抑制肿瘤细胞

的增殖、促进其凋亡。

综上所述, 抗 her-2 人源单克隆抗体曲妥珠单抗能够抑制结肠癌细胞 SW-620 细胞的增殖, 促进其凋亡, 同时与奥沙利铂具有协同作用。故而, 曲妥珠单抗有望成为高表达 her-2 结肠癌的靶向性治疗药物, 且在临床在手术、化疗和放疗的辅助治疗方面有着广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France; //International Agency for Research on Cancer, 2010[2010-08-01]. <http://globocan.iarc.fr>.
- 2 Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1177-1190.
- 3 Ahmad M, Attoub S, Singh MN, et al. Gamma-synuclein and the progression of cancer. *FASEB J*, 2007, 21(13): 3419-3430.
- 4 De Mattia E, Cecchin E, Toffoli G. Pharmacogenomics of intrinsic and acquired pharmacoresistance in colorectal cancer: toward targeted personalized therapy. *Drug Resist Updat*, 2015, 20(4): 39-70.
- 5 Birkman EM, Avoranta T, Ålgars A, et al. EGFR gene copy number decreases during anti-EGFR antibody therapy in colorectal cancer. *Hum Pathol*, 2018, [Epub ahead of print].
- 6 王珊珊, 梅金红. HER2 与肿瘤浸润转移. *生命的化学*, 2008, 28(5): 566-568.
- 7 Pandya K, Wyatt D, Gallagher B, et al. PKCα attenuates jagged-1-mediated notch signaling in ErbB-2-positive breast cancer to reverse trastuzumab resistance. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(1): 175-186.
- 8 Lin Z, Lu Y, Meng Q, et al. miR372 promotes progression of liver cancer cells by upregulating erbB-2 through enhancement of YB-1. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 494-507.
- 9 Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel)*, 2018, 6(2): 31-41.
- 10 李春莲, 周旭婕, 姜培培, 等. RNA 结合蛋白 38 通过增加人表皮

- 生长因子受体 2 的表达诱导乳腺癌 BT474 细胞对曲妥珠单抗的敏感性. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(3): 172-178.
- 11 许惠玉, 陈志伟, 郭洪英. 岩大戟内酯 B 诱导乳腺癌 MCF7 细胞凋亡实验研究. *中国医学创新*, 2012, 9(13): 1-3.
- 12 Pan G, Li D, Li X, *et al.* SPECT/CT imaging of HER2 expression in colon cancer-bearing nude mice using. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(4): 765-770.
- 13 Takegawa N, Yonesaka K. HER2 as an Emerging oncotarget for colorectal cancer treatment after failure of anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Colorectal Cancer*, 2017, 16(4): 247-251.
- 14 Ménard S, Casalini P, Campiglio M, *et al.* HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol*, 2001, 12(Suppl 1): S15-S19.
- 15 Lee JH, Kim HM, Koo JS. Differential expression of cancer-associated fibroblast-related proteins in ductal carcinoma *in situ* according to molecular subtype and stromal histology. *Pathobiology*, 2018, 17(6): 1-11.
- 16 梁霞, 张勇晶, 刘冰, 等. HER-2 基因 Ile655Val 多态性与结直肠癌易感性分析. *中华医学遗传学杂志*, 2009, 26(3): 302-305.
- 17 Buhmeida A, Assidi M, Al-Maghrabi J, *et al.* Membranous or cytoplasmic HER2 expression in colorectal carcinoma: evaluation of prognostic value using both IHC - BDISH. *Cancer Invest*, 2018, 36(2): 129-140.
- 18 李东升, 王巍, 李晴, 等. 结直肠癌组织中 Her-2 和 Claudin-1 的表达及意义. *广东医学*, 2012, 33(2): 237-239.
- 19 Zhu H, Zhang G, Wang Y, *et al.* Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. *Cancer Sci*, 2010, 101(5): 1156-1162.
- 20 Rebischung C, Barnoud R, Stéfani L, *et al.* The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer*, 2005, 8(4): 249-252.
- 21 Liu D, Li X, Chen C, *et al.* Target-specific delivery of oxaliplatin to HER2-positive gastric cancer cells. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 8079-8087.
- 22 Huang R, Sun Y, Zhang XY, *et al.* Biological evaluation of a novel Herceptin-platinum (II) conjugate for efficient and cancer cell specific delivery. *Biomed Pharmacother*, 2015, 73: 116-122.
- 23 Carter WB, Niu G, Ward MD, *et al.* Mechanisms of HER2-induced endothelial cell retraction. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(10): 2971-2978.
- 24 Hudziak RM, Lewis GD, Shalaby MR, *et al.* Amplified expression of the HER2/ERBB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor alpha in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(14): 5102-5106.
- 25 张丽华, 李静. 曲妥珠单抗联合紫杉醇诱导过表达 HER-2 的乳腺癌裸鼠皮下移植瘤乳腺癌细胞凋亡的作用机制和效果研究. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(14): 1373-1377.

收稿日期: 2018-08-15 修回日期: 2018-11-11

本文编辑: 罗云梅