

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)06-0609-04

PDCD4 重组慢病毒载体的构建、包装及其对前列腺癌细胞增殖的影响

张克克¹, 张小芳², 王福利¹, 张翔², 武国军¹, 王磊², 杨安钢³, 张瑞^{2*}, 袁建林^{1*}(第四军医大学: ¹西京医院泌尿外科, ²生物化学与分子生物学教研室, ³免疫学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 构建表达程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)的慢病毒表达载体, 建立能够稳定表达目的基因的前列腺癌 PC3 细胞亚株。研究 PDCD4 分子对前列腺癌细胞增殖的影响。方法 利用 PCR 扩增 PDCD4 编码区片段, 克隆入 pENTRA-3C 入门载体, 利用 LR clonase II 重组酶将目的基因片段转入 pLenti-6.3 慢病毒表达载体并包装相应的慢病毒, 以表达红色荧光蛋白 mCherry 的 pLenti-6.3-mCherry 慢病毒载体包装的慢病毒为对照, 感染人前列腺癌 PC3 细胞, 通过杀稻瘟素 (blasticidin) 筛选出能够稳定过表达 PDCD4 蛋白的细胞亚株。利用 Western blot 法检测 PDCD4 蛋白的表达量, MTT 法和平板克隆形成实验检测细胞增殖能力的变化。结果 构建了重组慢病毒载体 pLenti6.3-PDCD4。利用重组慢病毒表达系统筛选稳定过表达 PDCD4 蛋白的细胞亚株, 并用 Western blot 法进行了验证。MTT 法及平板克隆形成实验结果显示 PDCD4 高表达的 PC3 细胞亚株的增殖能力受到抑制。结论 成功构建了表达 PDCD4 分子的慢病毒表达载体, 筛选出稳定表达 PDCD4 的 PC3 细胞株。过表达的 PDCD4 分子可以显著抑制 PC3 前列腺癌细胞的增殖。

[关键词] PDCD4; 慢病毒; 前列腺癌; 细胞增殖

[中图分类号] R392.12, Q255, R737.25 **[文献标志码]** A

我国男性泌尿生殖系统的恶性肿瘤中, 前列腺癌发病率已经居于各种癌症的第 3 位^[1]。前列腺癌的发病机制和治疗学研究越来越引起大家的关注和重视。程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 是近年来新发现的一种肿瘤抑制因子。在肺癌、乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、肝细胞癌等多种恶性肿瘤^[2-4]中均检测到 PDCD4 的 mRNA 及蛋白表达减少甚至缺失, 而且它与肿瘤病理分期及预后密切相关。PDCD4 表达减少会引起 TNF- α 诱导的 IL-6 和 IL-8 的分泌。而 TNF- α 能诱导 PDCD4 降解, 该过程可被雷帕霉素阻断^[5]。本研究拟构建出能过表达 PDCD4 蛋白的慢病毒载体, 感染人前列腺癌 PC3 细胞系, 筛选出稳定过表达 PDCD4 的细胞亚株, 并观察其对前列腺癌细胞增殖能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 前列腺癌 PC3 细胞株由第四军医大学西京医院泌尿外科实验室保存。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、DNA marker、pMD18T 载体, 小提质粒试剂盒, 胶回收试剂盒, One Step PrimeScript[®] miRNA cDNA Synthesis Kit (Perfect Real Time), SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 均购自 TaKaRa 公司; 质粒 pLenti6.3、pENTR-3C、DMEM 培养液、转染试剂 Lipofectamine[™] 2000 和 LR clonase II 酶

购自 Invitrogen 公司; psPAX2 和 PMD2.G 病毒包装辅助质粒购自 Addgene 公司; 胎牛血清购自天津源洋生物制品科技有限公司; DH5 α 由本实验室保存, Top10 感受态细胞购自天根生物公司。pLenti6.3-mCherry 质粒由第四军医大学生物化学与分子生物学教研室张健副教授惠赠。兔抗人 PDCD4 单克隆抗体 (mAb), 兔抗人 β -actin mAb 购自 Epitomics 公司, HRP 标记的山羊抗兔二抗购自北京中山金桥公司; 其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。所用引物由上海生工生物技术有限公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 PDCD4 慢病毒载体的构建 检索 GenBank, 确定 PDCD4 基因编码区序列, 利用 Primer5.0 软件设计克隆基因的上下游引物序列, 具体序列如下, P1: 5'-ctcgaggaggaggaggaaatgtgcaactaaaatggaaca-3'; P2: 5'-gaattcggcgtgccccttgaccccaa-3'。上下游引物序列分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。采用 P1 和 P2 引物, 以人源胎肝 cDNA 文库为模板进行 PCR, 并将胶回收的目的片段通过 T/A 连接直接连入 pMD18T 克隆载体, 构建克隆质粒 T-PDCD4, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定并送公司测序。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 T-PDCD4 载体, 温度 37 $^{\circ}$ C, 时间 6 h。酶切产物在 T4 DNA 连接酶作用下, 16 $^{\circ}$ C, 连接过夜。将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞。对测序正确的质粒进行载体重组: 将 pENTR-3C-PDCD4 质粒与 pLenti6.3 质粒在 LR clonase 酶 II 作用下进行重组, 温度 25 $^{\circ}$ C, 时间 3 h, 而后用蛋白酶 K 作用 10 min 后转化 Top10 感受态细胞,

收稿日期: 2013-02-28; 接受日期: 2013-03-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30872583)

作者简介: 张克克 (1986-), 男, 河南舞钢人, 硕士研究生

Tel: 18710931083; E-mail: zhangkeke13@126.com

* Corresponding authors, 张瑞, E-mail: ruizhang@fmmu.edu.cn; 袁建林, E-mail: jianliny@fmmu.edu.cn

选取测序正确的克隆提取质粒并进行慢病毒包装。

1.2.2 慢病毒载体的包装 转染前 24 h, 调整 293T 细胞密度为 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 6 cm 细胞培养皿, 37°C 、50 mL/L CO_2 培养箱内培养。待细胞汇合度达 60% ~ 70% 时即可转染。相应质粒的溶液 (pLenti6.3-PDCD4 载体 4 μg , PsPAX2 载体 3 μg , PMD2.G 载体 1 μg) 与无血清高糖 DMEM 在 1.5 mL EP 管内混合, 总体积 0.5 mL; 将 20 μL Lipofectamine™ 2000 试剂在另一 EP 管中与无血清高糖 DMEM 混合, 总体积 0.5 mL, 室温下孵育 5 min。将含有 DNA 和脂质体的溶液混合, 轻柔混匀, 室温下孵育 20 min。将上述混合液滴加入 293T 细胞的培养液中, 混匀, 于 37°C 、50 mL/L CO_2 细胞培养箱中培养。培养 6 h 后更换为含 100 mL/L 血清的高糖 DMEM 培养液, 于 37°C 、50 mL/L CO_2 培养箱内继续培养 48 h。感染 48 h 后收集上清液, 于 4°C 、4 000 r/min 离心 10 min, 除去细胞碎片。使用 0.45 μm 滤器过滤上清液, 分装后 -80°C 长期保存。同样办法制备含 pLenti6.3-mCherry 载体的对照组慢病毒。

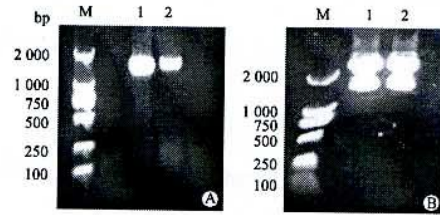
1.2.3 筛选稳定表达蛋白 PDCD4 和 mCherry 的细胞 将 PC3 细胞铺于 6 孔板中, 细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。培养 1 d 后, 细胞汇合度达 30% ~ 50% 时开始进行病毒感染, 将病毒液和 DMEM 培养液按 1:1 比例混合, 每孔加入 2 mL。预留 1 孔做阴性对照, 不加病毒液。2 d 后更换为含 100 mL/L 血清的 DMEM 培养液。待细胞长满后加入含有 blasticidin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养液 2 mL, 每 3 ~ 4 d 更换该培养液直至阴性对照死亡。经 10 ~ 14 d 筛选后, 获得稳定表达 PDCD4 的 PC3 细胞亚株。同法筛选稳定表达 mCherry 的细胞亚株。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 调整细胞悬液密度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$, 加入 96 孔板, 每孔 200 μL , 每个细胞株在 1 块 96 孔板上接种 5 孔, 另设 1 个对照孔, 共接种 7 块板。常规培养, 每 2 d 换液 1 次; 每日固定时间处理一块板, 每孔加入 20 μL MTT, 37°C 孵育 4 h; 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 酶联免疫仪选择 490 nm 测定吸光度 (A) 值, 取 5 孔平均值。

1.2.5 Western blot 法检测 PDCD4 蛋白表达 使用 NP-40 细胞裂解液于冰上裂解细胞 30 min, 4°C 高速离心收集蛋白裂解液。采用 BCA 法定量蛋白质浓度, 调整到 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取总量为 30 μg 的蛋白裂解液经 SDS-PAGE 后转移到硝酸纤维素膜上, 以免抗人 PDCD4 蛋白的 mAb 为一抗 (使用浓度 1:2 000), HRP 标记的山羊抗兔的抗体为二抗 (使用浓度 1:150 000), 采用化学发光系统检测外源 PDCD4 蛋白在前列腺癌细胞系 PC3 中的表达; 兔抗人 β -actin mAb 为一抗进行内参检测。X 光胶片压片显影, 证实检测结果。

2 结果

2.1 pLenti6.3-PDCD4 载体的构建 经 PCR 扩增后, 将 PDCD4 目的片段克隆入 pENTRA-3C 入门载体, 挑取阳性克隆进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 (图 1), 送检测序验证序列正确。进行 pENTRA-3C-PDCD4 质粒和 pLenti6.3 质粒重组, 使用 CMV-F 测序, 证实序列正确, 载体成功构建。



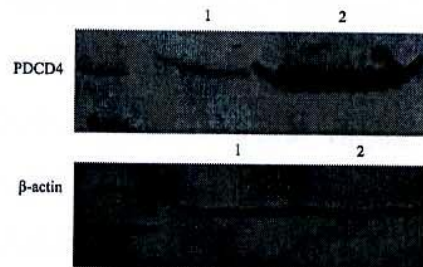
A: PCR 产物双酶切图。M: DL2000 DNA marker; 1, 2: PDCD4 PCR 产物。B: 载体双酶切图。M: DL2000 DNA marker; 1, 2: pEnttra-3C-PDCD4 用 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切。

图 1 PCR 产物及载体双酶切图

2.2 稳定过表达 PDCD4 的 PC3 前列腺癌细胞亚株的建立和筛选 加入含有杀稻瘟素 (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养液 48 h 后, 各组细胞开始出现死亡。7 d 左右, 亲本未感染组细胞全部死亡, PC3-Lv-PDCD4 和 PC3-Lv-mCherry 组均有细胞存活, 继续筛选 1 周, 细胞重新扩增培养。

2.3 外源 PDCD4 在 PC3 前列腺癌细胞系中的表达

采用重组慢病毒感染操作将 Lv-PDCD4 稳定转入 PC3 前列腺癌细胞中, 以 Lv-mCherry 感染的细胞作为阴性对照, 杀稻瘟素稳定筛选 2 周后收集细胞裂解液, 利用 PDCD4 蛋白的 mAb 进行检测。结果显示: 重组慢病毒介导表达的 PDCD4 基因在前列腺癌细胞系中高效表达 (图 2)。



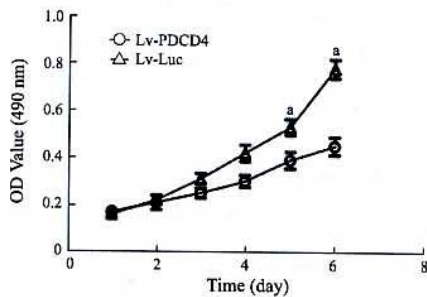
1: PC3-Lv-mCherry 细胞; 2: PC3-Lv-PDCD4 细胞。

图 2 Western blot 法检测重组慢病毒介导表达的 PDCD4 基因在 PC3 中的表达

2.4 PDCD4 对人前列腺癌建系细胞 PC3 体外增殖能力的影响 MTT 法检测 PC3-Lv-mCherry 和 PC3-Lv-PDCD4 细胞亚株增殖能力的差别 (图 3)。结果显示: PC3-Lv-PDCD4 细胞亚株的增殖能力较对照组受到显著抑制 ($P < 0.05$)。

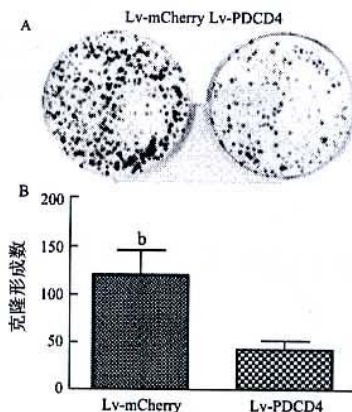
2.5 PDCD4 对人前列腺癌建系细胞 PC3 体外克隆形成能力的影响 平板克隆形成实验检测 PC3-Lv-mCherry 和 PC3-Lv-PDCD4 细胞亚株单克隆细胞生长能力的差别 (图 3)。结果显示: 稳定过表达 PDCD4 可以高效抑制 PC3 前列腺癌细胞在培养平板上形成克隆的能力。与 Lv-mCherry 对照组相比, PC3-Lv-

PDCD4 细胞组单克隆形成的数目明显少于 PC3-Lv-PDCD4 细胞组,具有显著统计学差异($P < 0.01$)。



* $P < 0.05$ vs Lv-Luc.

图3 外源过表达 PDCD4 抑制前列腺癌细胞 PC3 的增殖



* $P < 0.01$ vs Lv-PDCD4. A: 慢病毒感染 PC3 细胞亚株的平板克隆形成实验; B: 平板克隆形成实验的统计学分析。

图4 PDCD4 抑制前列腺癌细胞系的单克隆生长能力

3 讨论

目前,关于 PDCD4 在前列腺癌中的表达谱、生物学功能及其作用机制的相关文献较少。本研究利用重组慢病毒表达系统成功建立了可以稳定表达外源 PDCD4 前列腺癌细胞亚株,希望能够明确 PDCD4 对前列腺癌细胞增殖的影响。

人们在致瘤性转化小鼠表皮细胞模型 JB6 (P-) 中发现其能抑制由致癌物质诱发的致瘤性转化。PDCD4 转基因小鼠有着较低的肿瘤发生率和乳头瘤病毒致癌转变率^[3]。雷帕霉素靶蛋白复合体 1 使核糖体蛋白 S6 激酶 1 (p70S6K1) 磷酸化,引起 eIF4B 和 PDCD4 磷酸化,从而阻断 eIF4A 从 eIF4E-eIF4G 复合体上分离,进而抑制 mRNA 上结构紧凑的 5'非编码区翻译,这表明 PDCD4 在蛋白合成的调控中发挥着作用^[6]。此外, PDCD4 表达下调与多种肿瘤的转移都有密切的关系,如结肠直肠癌^[7],肾细胞癌^[8],胃癌^[9],以及腺样囊性癌 (adenoid cystic carcinoma ACC)^[10]等。它还可以通过抑制 MAP4K1 的表达阻

断由转录因子 AP-1 所介导的结肠癌浸润^[11]。而降低 PDCD4 的表达能够解除转化细胞对正常 DNA 损伤的应答反应,从而使 DNA 损伤的细胞免于凋亡^[12]。前期研究表明,与正常组织相比, PDCD4 在癌细胞中的表达是减少的, PDCD4 在肿瘤启动中也是靶向降解的,然而 PDCD4 的调控机制尚不清楚。

大量的研究都报道了 PDCD4 在蛋白翻译和 AP-1 依赖的转录激活中的抑制功能^[13]。然而对 PDCD4 在细胞周期中的功能的研究中却得出了前后矛盾的结果。在乳腺癌细胞中, PDCD4 使处于 G0-G1 期的时相增加而没有影响到细胞周期中的其它时相^[14]。在胃癌细胞中, PDCD4 推迟了 G1 期到 G2/M 期时相的转变^[15]。在卵巢癌中, PDCD4 作为有致癌作用的 miR-182 的靶基因能够减轻其引起的癌细胞表型的变化,从而抑制卵巢癌细胞发生浸润和转移^[16]。在本研究中,外源过表达的 PDCD4 能够显著抑制前列腺癌细胞的体外生长能力和单克隆增殖能力,提示其在前列腺癌细胞的增殖过程中发挥负向调控作用。

综上所述,本实验成功构建了可以稳定过表达 PDCD4 的重组慢病毒载体,筛选出稳定高表达 PDCD4 蛋白的 PC3 细胞亚株,证实了感染后的细胞亚株增殖能力受到明显抑制,为下一步研究 PDCD4 对前列腺癌细胞的影响奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(2): 77-80.
- [2] Chen Y, Knäsel T, Kristiansen G, et al. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis[J]. J Pathol, 2003, 200(5): 640-646.
- [3] Wei N, Liu SS, Chan KK, et al. Tumour suppressive function and modulation of programmed cell death 4 (PDCD4) in ovarian cancer [J/OA]. PLoS One, 2012, 7(1): e30311.
- [4] Afonja O, Juste D, Das S, et al. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis [J]. Oncogene, 2004, 23(49): 8135-8145.
- [5] Lee WM, Paik JS, Cho WK, et al. Rapamycin enhances TNF- α -induced secretion of IL-6 and IL-8 through suppressing PDCD4 degradation in orbital fibroblasts [J]. Curr Eye Res, 2013. [Epub ahead of print]
- [6] Dennis MD, Jefferson LS, Kimball SR. Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis[J]. Biol Chem, 2012, 287(51): 42890-42899.
- [7] Horiuchi A, Iinuma H, Akahane T, et al. Prognostic significance of PDCD4 expression and association with microRNA-21 in each Dukes' stage of colorectal cancer patients[J]. Oncol Rep, 2012, 27(5): 1384-1392.
- [8] Li X, Xin S, Yang D, et al. Down-regulation of PDCD4 expression is an independent predictor of poor prognosis in human renal cell car-

- cinoma patients[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(3): 529 - 535.
- [9] Motoyama K, Inoue H, Mimori K, et al. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(5): 1089 - 1095.
- [10] Qi C, Shao Y, Li N, et al. Prognostic significance of PDCD4 expression in human salivary adenoid cystic carcinoma [J/OA]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 491.
- [11] Yang HS, Matthews CP, Clair T, et al. Tumorigenesis suppressor Pdc4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(4): 1297 - 1306.
- [12] Bitomsky N, Wethkamp N, Marikkannu R, et al. siRNA-mediated knockdown of Pdc4 expression causes upregulation of p21 (Waf1/Cip1) expression[J]. *Oncogene*, 2008, 27(35): 4820 - 4829.
- [13] Lankat-Buttgereit B, Lenschen B, Schmidt H, et al. The action of Pdc4 may be cell type specific; evidence that reduction of dUTPase levels might contribute to its tumor suppressor activity in Bon-1 cells [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(1): 157 - 164.
- [14] Afonja O, Juste D, Das S, et al. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis [J]. *Oncogene*, 2004, 23(49): 8135 - 8145.
- [15] Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, et al. S6K1 and beta TRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth[J]. *Science*, 2006, 314(5798): 467 - 471.
- [16] Wang YQ, Guo RD, Guo RM, et al. MicroRNA-182 promotes cell growth, invasion and chemoresistance by targeting programmed cell death 4 (PDCD4) in human ovarian carcinomas[J]. *Cell Biochem*, 2013. Jan 7. doi: 10.1002/jcb.24488. [Epub ahead of print]

(上接 608 页)

生长受到抑制,与临床中得到的结论一致。尽管给予抗 HER2 靶向治疗后可以延缓疾病进展,但是临床治疗过程中,仍存在初始治疗无效或治疗一度有效后再次出现疾病进展的现象。Albanell 等^[13]在 2001 年首次提出“曲妥珠单抗耐药”的概念,对于其耐药机制可能与多种因素相关,仍需要进一步探索^[14-15]。

本实验构建的 myc-HER2 重组体在真核细胞中获得了表达,易于检测。表达的 HER2 蛋白能够促进细胞生长,在 HER2 的单克隆抗体曲妥珠单抗作用下可以抑制细胞生长。myc-HER2 重组体的构建成功,为后续获得稳定表达 HER2 基因的细胞株并研究曲妥珠单抗耐药的分子机制奠定基础。

参考文献:

- [1] 蒋凯,杨智洪,王朝云,等. siRNA 抑制 ErbB2 基因的表达及对乳腺癌细胞生长的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(3): 257 - 259.
- [2] Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 receptor in breast cancer: Pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy [J/OA]. *Chemother Res Pract*, 2012, 2012: 743193.
- [3] 江泽飞,邵志敏,徐兵河. 人表皮生长因子受体 2 阳性乳腺癌临床诊疗专家共识[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(2): 158 - 160.
- [4] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. Her-2 阳性乳腺癌临床诊疗专家共识[J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(4): 314 - 318.
- [5] Meric-Bernstam F, Hung MC. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6326 - 6330.
- [6] 程联胜,查昭,席甲甲,等. 腺病毒介导的 RNA 干扰对乳腺癌 SKBR3 细胞 HER2 的下调及生长抑制效应[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(8): 691 - 695.
- [7] Izumi Y, Xu L, di TE, et al. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail [J]. *Nature*, 2002, 416(6878): 279 - 280.
- [8] Nuti M, Bellati F, Visconti V, et al. Immune effects of trastuzumab [J/OA]. *J Cancer*, 2011, 2: 317 - 323.
- [9] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(11): 783 - 792.
- [10] Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(16): 3676 - 3685.
- [11] Marty M, Cogne F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(19): 4265 - 4274.
- [12] Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort[J]. *Lancet*, 2010, 375(9712): 377 - 384.
- [13] Albanell J, Baselga J. Unraveling resistance to trastuzumab (Herceptin); insulin-like growth factor-I receptor, a new suspect[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(24): 1830 - 1832.
- [14] Hynes NE, Dey JH. PI3K inhibition overcomes trastuzumab resistance; blockade of ErbB2/ErbB3 is not always enough[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(5): 353 - 355.
- [15] 边莉,江泽飞. 曲妥珠单抗原发耐药与继发耐药的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(6): 564 - 567.