

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.03

· 基础研究 ·

## 抗肺癌单克隆抗体 15A1 的靶抗原在肺癌细胞中的表达及其转位特征

孙立新, 冉宇靓, 杨薇薇, 孙力超, 张晓艳, 容雁, 刘军, 杨治华 ( 中国医学科学院 北京协和医学院 肿瘤研究所 分子肿瘤学国家重点实验室 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室 抗体工程药物与肿瘤标志物中关村开放实验室, 北京 100021 )

[ 摘要 ] 目的: 分析抗肺癌单克隆抗体 15A1 的靶抗原在肺癌细胞的表达、亚细胞定位和转位的特征, 研究 15A1 的体内外抑瘤功能, 为肺癌靶向治疗提供候选抗体药物及靶标。方法: 采用免疫荧光及细胞流式术检测单克隆抗体 15A1 靶抗原在肺癌细胞中的表达及定位, 免疫组化分析其在人肺癌组织中的表达; CCK-8 法和裸鼠移植瘤体内抗体抑瘤实验评估该单克隆抗体对肺癌细胞的抑制作用。结果: 单克隆抗体 15A1 识别的抗原在人肺腺癌细胞( A549、ANIP-973、GLC-82、Calu-3、H157、H1299)、人肺鳞癌细胞( GLC-P、H520)、人小细胞肺癌细胞( H446、H209)、人大细胞肺癌细胞( PG、H460) 共 12 种细胞的胞内及胞膜上均有表达, 肺腺癌细胞的表达强度明显高于其他病理类型肺癌细胞; 该抗原在 75% 的人肺癌组织中非常特异地上调表达。该抗原在肺腺癌细胞中相当一部分从胞核转位至胞质, 在肺鳞癌细胞中仅有小部分从细胞核转位至细胞质; 转位抗原的一部分表达于膜表面, 并同样是肺腺癌细胞的表达强度强于肺鳞癌细胞。该单克隆抗体体内外显著抑制肺癌细胞的生长, 抑瘤率在 25% ~ 80%。结论: 单克隆抗体 15A1 在体内外能显著抑制肺癌的生长, 其靶抗原在人肺癌组织和细胞中特异上调表达, 并能以特定转位模式表达于肺癌细胞膜上, 可能是一个肺癌靶向治疗的潜在靶标。

[ 关键词 ] 肺癌; 功能性单克隆抗体; 靶抗原; 靶向治疗; 转位; 靶标

[ 中图分类号 ] R734.2; R392.1

[ 文献标志码 ] A

[ 文章编号 ] 1007-385X(2011)02-0133-06

## Expression and translocation of targeted antigen of anti-lung cancer 15A1 monoclonal antibody in lung cancer cells

SUN Li-xin, RAN Yu-liang, YANG Wei-wei, SUN Li-chao, ZHANG Xiao-yan, RONG Yan, LIU Jun, YANG Zhi-hua ( State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Engineering Laboratory for High-level Expression in Mammalian Cells, Zhongguancun Science Park Open Laboratory of Engineering Antibody Drugs and Cancer Biomarker, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China )

[ Abstract ] **Objective:** To study the expression, subcellular localization and translocation of the targeted antigen of anti-lung cancer 15A1 mAb in lung cancer cells, and to study the inhibitory function of 15A1 mAb *in vitro* and *in vivo* against lung cancer cells, so as to provide target and antibody drug candidate for targeted therapy of lung cancer. **Methods:** The expression and localization of the targeted antigen of 15A1 mAb in lung cancer cell lines and lung cancer tissues were studied by immunofluorescence and flow cytometry. CCK-8 proliferation assay and tumor xenograft experiment were performed to evaluate the inhibitory function of 15A1 mAb against lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Results:** The antigen of 15A1 mAb was expressed in the cytoplasm and cell surface of 12 lung cancer cell lines, including human lung adenocarcinoma cell lines ( A549, ANIP-793, GLC-82, Calu-3, H157, H1299 ), squamous carcinoma cell lines ( GLC-P, H520 ), small cell lung cancer cell lines ( H446, H209 ), and large cell lung cancer cell lines ( PG, H460 ), with the highest expression level seen in the adenocarcinoma cell lines. The upregulated expression of the targeted antigen of 15A1 mAb was found in about 75% of human lung cancer tissues. Most targeted antigen translocated from the nucleus to cyto-

[ 基金项目 ] 国家重点基础研究发展计划( 973 计划 ) 项目( No. 2009CB521804 ); 国家科技重大专项课题( No. 2009ZX09401-005 和 2009ZX09103-713 ) 资助。Supported by the National Basic Research Program of China ( No. 2009CB521804 ) and the National S & T Major Project ( No. 2009ZX09401-005 and 2009ZX09103-713 )

[ 作者简介 ] 孙立新( 1976 - ), 女, 河北省石家庄市人, 硕士, 主要从事肿瘤抗体靶向治疗的研究。E-mail: sunlixinlx@yahoo.com.cn

[ 通信作者 ] 冉宇靓( Ran Yu-liang, Corresponding author ), E-mail: ran\_yuliang@126.com

[ 网络出版 ] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110412.1810.004.html>

plasm in lung adenocarcinoma cells, but only part of the antigen translocated to the cytoplasm in lung squamous carcinoma cells. Some antigen also translocated to the cell membrane, which was more significantly in adenocarcinoma cells than in squamous carcinoma cells. The 15A1 mAb greatly suppressed proliferation of lung cancer cells *in vivo* and *in vitro*, with the inhibitory rate being 25%–80%. **Conclusion:** The 15A1 mAb can significantly inhibit growth of lung cancer cells *in vivo* and *in vitro*, and its targeted antigen is highly expressed on human lung cancer tissues and cells and can translocate to the cell surface, suggesting that 15A1 mAb might become a candidate target for lung cancer therapy.

[ **Key words** ] lung cancer; functional monoclonal antibody; targeted antigen; targeted therapy; translocation; target  
[ Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 133-138 ]

目前,分子靶向治疗药物在肺癌临床治疗中显示出较传统化疗药物更为令人满意的疗效,如吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)和西妥昔单抗(getuximab)等<sup>[1-7]</sup>。但这些药物均针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)靶点,受到患者EGFR突变及k-RAS突变的影响。近年已有针对ALK<sup>[8]</sup>、IGF-1R<sup>[9]</sup>和mTOR<sup>[10]</sup>的新药在临床试验中显示出良好的应用前景。然而,肺癌作为一种多因素导致的恶性疾病,仍然需要进一步研发针对其他新靶标的靶向治疗药物<sup>[11]</sup>。本课题组曾建立了一种基于功能性单克隆抗体库和功能差异细胞模型的免疫蛋白质组学技术平台<sup>[12]</sup>,并以此筛选获得了多个抗肺癌的功能性鼠单克隆抗体<sup>[13-16]</sup>,其中编号为15A1的单克隆抗体对人肺癌细胞系GLC-82有明显的抑制作用。本研究拟观察单克隆抗体15A1所识别的抗原在多种病理类型的人肺癌细胞系,包括人肺腺癌、鳞癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌细胞系,以及多种类型的人肺癌组织中的表达,亚细胞定位和核膜转位特征;进一步探讨该单克隆抗体在体内外对人肺癌细胞生长的抑制作用,以期为肺癌的靶向治疗提供潜在的候选靶标和靶向治疗抗体。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和材料

人肺腺癌细胞系A549、ANIP-973、GLC-82、Calu-3、H157、H1299,人肺鳞癌细胞系GLC-P、H520,人小细胞肺癌细胞系H446、H209,人大细胞肺癌细胞系PG、H460,人胚肺正常二倍体细胞系2BS,小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0-AG14(以下简称SP2/0),杂交瘤细胞15A1均为本室保藏。4~6周龄BALB/c(nu/nu)裸鼠购自北京维通利华实验动物技术公司[动物合格证号为SCXK(京)2007-0001]。细胞培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清为北京元亨圣马生物技术公司生产,异硫氰酸荧光黄(FITC)标记的羊抗鼠IgM购自Jackson公司,SBA Clonotyping System/HRP分型试剂盒为Southern Bio-

tech公司产品,UltraSensitive™S-P免疫组化试剂盒购自迈新公司,苯基疏水柱料购自GE公司。56例人肺癌及癌旁正常组织均取自中国医学科学院肿瘤医院外科的手术切除病例。

### 1.2 细胞培养

A549细胞用含10%胎牛血清的McCoy'5A培养基培养;GLC-82、H520、GLC-P、2BS细胞采用含10%FBS的DMEM培养基培养;ANIP-973、H157、H1299、H446、PG细胞用含10%FBS的RPMI 1640培养基培养;SP2/0细胞、杂交瘤细胞15A1培养于含10%胎牛血清的DMEM-H培养液中;Calu-3细胞采用含10%FBS的MEM培养基培养。

### 1.3 单克隆抗体15A1上清的收集及抗体的纯化

杂交瘤细胞15A1生长至80%汇合时,换成无血清培养液,连续培养5d,收集培养上清。IgM类单克隆抗体经苯基疏水柱和分子筛柱两步纯化,纯化后抗体经SDS-PAGE鉴定其纯度。

### 1.4 细胞免疫荧光检测单克隆抗体15A1识别的抗原在肺癌细胞的分布

用PBS洗涤接种有不同肺癌细胞的玻片1次。活细胞免疫荧光检测时,细胞无需固定和通透处理,细胞直接与抗体孵育。固定细胞免疫荧光检测时需先加入4%多聚甲醛固定细胞15min,弃固定液,再加入0.5%Tritonx-100通透5min,PBST洗涤5min×5次。加入一抗室温孵育1h,用0.1%BSA的PBST洗涤5次,加入4%多聚甲醛固定15min,洗涤后加入荧光二抗室温下避光孵育30min,洗涤后用含50%甘油的2μg/ml的DAPI封片。

### 1.5 流式细胞术检测单克隆抗体15A1与肺癌细胞膜蛋白的结合

收获对数生长期的肺癌细胞系A549、GLC-82、GLC-P细胞,1×10<sup>6</sup>个/管,加入单克隆抗体15A1至终质量浓度300μg/ml或PBS,孵育1h,PBS洗涤3次,加入FITC标记的二抗避光反应1h,再用PBS洗涤3次,上流式细胞仪检测。

### 1.6 免疫组化检测单克隆抗体15A1识别肺癌组

组织的特异性

石蜡包埋的人肺癌及癌旁正常组织的免疫组化检测采用 S-P 法,15A1 杂交瘤上清以 1:50 稀释作为一抗。操作程序按试剂盒说明书进行,以镜下阳性细胞数 < 10% 为阴性,10% ~ 40% 为 +,41% ~ 70% 为 ++, > 70% 为 +++。

1.7 CCK-8 法检测单克隆抗体 15A1 对肺癌细胞增殖的抑制

在 96 孔培养板中接种细胞  $4 \times 10^3$  个,培养 24 h 后加入纯化的单克隆抗体 15A1,48 h 换含单克隆抗体 15A1 的新鲜培养液 1 次,5 d 后,每孔加入 10% 体积的 CCK-8,1 h 后测定  $D_{450}$  值。按照以下公式计算细胞增殖抑制率:抑制率(%) = (对照组  $D_{450}$  - 实验组  $D_{450}$ ) / 对照组  $D_{450} \times 100\%$ 。

1.8 裸鼠移植瘤治疗实验观察单克隆抗体 15A1 的抑瘤作用

利用小鼠接种杂交瘤细胞产生腹水后小鼠血液中也持续存在高浓度的相应单克隆抗体的原理,采用肿瘤细胞以及产生单克隆抗体 15A1 的杂交瘤细胞同时接种小鼠的双接种模型,模拟单克隆抗体治疗小鼠肺癌移植瘤。将 BALB/c(nu/nu) 裸鼠分为杂交瘤细胞 15A1 实验组和 SP2/0 骨髓瘤细胞对照组,每组 6 只裸鼠。 $1.5 \times 10^6$  细胞/只裸鼠皮下接种人肺癌细胞系 GLC-82,并腹腔注射降脂烷。接种后 5 d 分别腹腔注射杂交瘤细胞 15A1、SP2/0 细胞  $2 \times 10^6$  个/只进行治疗。20 d 时处死小鼠,称取瘤质量,计算抑瘤率。

1.9 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS17.0 统计包,组间差异采用 *t* 检验或秩和检验。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗肺癌单克隆抗体 15A1 的纯化和鉴定

纯化后单克隆抗体 15A1 的 SDS-PAGE 图呈现出典型的鼠 IgM 抗体的特征(重链相对分子质量约为 80 000,轻链则为 26 000)。经薄层飞点扫描分析,其纯度 > 90%;亚类分析显示,该单克隆抗体重链为鼠 IgM  $\mu$  链,轻链为鼠  $\kappa$  链。

2.2 抗肺癌单克隆抗体 15A1 所识别的抗原在多种肺癌细胞系中的表达和亚细胞定位

固定细胞免疫荧光检测结果显示,抗肺癌单克隆抗体 15A1 所识别的抗原在人肺腺癌、鳞癌、小细胞癌和大细胞癌等肺癌细胞系中均有不同程度的表达,其中肺腺癌 A549、ANIP-973、GLC-82、Calu-3、H157、H1299 细胞的表达强度明显高于其他病理类

型(表 1)。该抗原在非肿瘤的人胚肺二倍体细胞 2BS 中完全定位于胞核;在鳞癌细胞中则主要定位于胞核,部分定位于胞质;在肺腺癌细胞中除胞核外,该蛋白还大量定位于胞质(图 1)。结果提示了该抗原在多种肺癌细胞系中发生了转位,转位模式极可能与病理类型相关。

表 1 单克隆抗体 15A1 靶抗原在多种人肺癌细胞系中的表达

Tab.1 Expression of 15A1 mAb targeting antigen in different human lung cancer cell lines

Type	Cell line	Immunofluorescence	
		Fixed cells	Viable cells
AD	A549	+++	+
	GLC-82	+++	+
	ANIP-973	+++	++
	Calu-3	+++	+
	H157	+++	++
SCC	H1299	+++	+
	GLC-P	+++	++
SCLC	H520	++	-
	H466	++	+
	H209	++	-
LC	PG	+++	+
	H460	++	+
NC	2BS	+	-

AD: Adenocarcinoma; SCC: Squamous cell carcinoma; SCLC: Small cell lung carcinoma; LC: Large cell lung carcinoma; NC: Normal lung cells

2.3 抗肺癌单克隆抗体 15A1 所识别的抗原可表达于多种肺癌细胞膜表面

采用活细胞免疫荧光检测 15A1 所识别的抗原在多种肺癌细胞膜表面的表达,结果(图 2)显示,非肿瘤的人胚肺二倍体细胞 2BS 未见膜表达,而多种肺腺癌细胞表面该抗原表达较强,肺鳞癌细胞表面虽也有表达,但强度较弱。

活细胞流式术检测也获得类似结果,其中肺鳞癌细胞 GLC-P 阳性率为 3.59%,平均荧光强度为 40.6;肺腺癌细胞系 GLC-82 膜表面的表达最强,其阳性率为 5.91%,平均荧光强度为 71.2。因此,GLC-82 细胞可用于下一步的 15A1 体内外功能研究。

2.4 抗肺癌单克隆抗体 15A1 所识别的抗原在人肺癌组织中特异地上调表达

免疫组化结果(表 2)发现,抗肺癌单克隆抗体

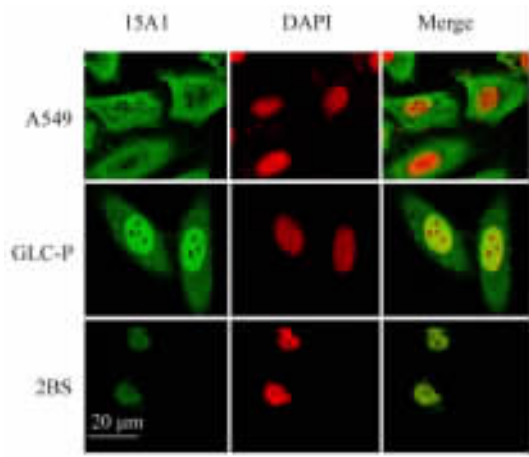


图 1 免疫荧光检测单克隆抗体 15A1 与固定的人肺癌细胞的结合

Fig. 1 Immunofluorescence detection of binding of 15A1 mAb with fixed lung cancer cell lines

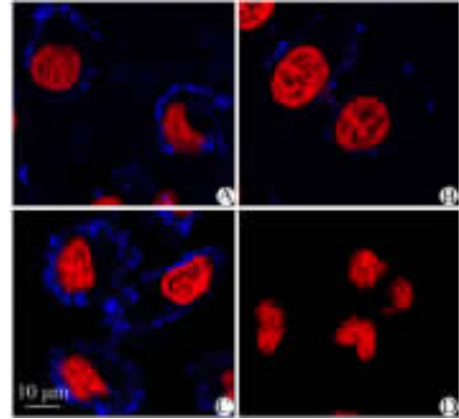


图 2 免疫荧光检测 15A1 抗体与肺癌活细胞的结合

Fig. 2 Immunofluorescence detection of binding of 15A1 mAb with living lung cancer cells

A: A549; B: GLC-P; C: GLC-82; D: 2BS

表 2 单克隆抗体 15A1 靶抗原在人肺癌组织及癌旁组织中的表达

Tab. 2 Expression of 15A1 mAb targeting antigen in human lung cancer and paracancerous tissues

Type	Expression of 15A1 targeting antigen [ n( % ) ]				Total	Positive rate( % )
	-	+	++	+++		
Lung cancer						
AD	8( 28.0 )	11( 39.0 )	6( 21.4 )	3( 10.7 )	28	71.43**
SCC	5( 25.0 )	9( 45.0 )	3( 15.0 )	3( 15.0 )	20	75.00**
Other	1( 12.5 )	6( 75.0 )	1( 12.5 )	0( 0.0 )	8	87.50**
Total	14( 25.0 )	26( 46.0 )	10( 17.8 )	6( 10.7 )	56	75.00**
Paracancer						
AD Para	26( 92.8 )	2( 7.1 )	0( 0.0 )	0( 0.0 )	28	7.14
SCC Para	20( 100.0 )	0( 0.0 )	0( 0.0 )	0( 0.0 )	20	0.00
Other Para	8( 100.0 )	0( 0.0 )	0( 0.0 )	0( 0.0 )	8	0.00
Total	54( 71.4 )	2( 25.0 )	0( 0.0 )	0( 0.0 )	56	3.57

AD: Adenocarcinoma; SCC: Squamous cell carcinoma; \*\*  $P < 0.01$  vs paracancer tissues

15A1 所识别的抗原在人肺癌组织中的表达显著地高于癌旁正常组织,但腺癌与鳞癌间无显著差别;在不同病理类型间的亚细胞定位表达模式与在多种固定的人肺癌细胞系中观察到的情况几乎完全一致(图 3),进一步提示该抗原在不同病理类型的肺癌间有着类型特异的转位模式。

2.5 抗肺癌单克隆抗体 15A1 抑制人肺腺癌细胞系 GLC-82 的增殖

用 CCK-8 法测定 15A1 对人肺癌细胞系 GLC-82 和 GLC-P 增殖的抑制作用,结果显示,单克隆抗体 15A1 在体外均可较显著地抑制人肺癌细胞系

GLC-82 和 GLC-P 的增殖,抑制率最高可达 25%;并且,它抑制肺腺癌细胞 GLC-82 增殖的作用强于抑制肺鳞癌细胞 GLC-P 的作用(图 4),这与其靶抗原在 GLC-82 和 GLC-P 细胞膜表面的表达情况一致。

2.6 抗肺癌单克隆抗体 15A1 抑制人肺腺癌 GLC-82 细胞小鼠移植瘤的生长

采用共接种模型模拟单克隆抗体 15A1 治疗人肺腺癌 GLC-82 裸鼠移植瘤模型 15 d 后,治疗组平均瘤重为( 0.111 ± 0.061 )g,而对照组 SP2/0 细胞移植瘤平均瘤重为( 0.558 ± 0.234 )g,抑制率达 80.1%(  $P < 0.01$  )。表明单克隆抗体 15A1 在体内

可显著抑制人肺腺癌 GLC-82 细胞移植瘤的生长。

### 3 讨论

膜蛋白因其亚细胞定位的优势已被公认为肿瘤靶向治疗的优选靶标<sup>[17]</sup>,多种新方法已被用来寻找细胞膜表面新蛋白靶标<sup>[18]</sup>。Eustace 等<sup>[19]</sup>曾报道,采用抗体结合激光激发灭活技术发现了具有新治疗靶标潜能的 HSP90,该蛋白在肿瘤中特异表达且可转位至肿瘤细胞膜表面。本课题组采用功能性单克隆抗体库技术和功能差异细胞模型筛选获得了大量抗肺癌的功能性抗体<sup>[13-14]</sup>,其中单克隆抗体 15A1 的靶抗原表达在快、慢增殖的 GLC-82 功能差异细胞模型间具有明显的差别(数据未列出)。

本研究采用免疫荧光检测发现,单克隆抗体 15A1 的靶抗原在多种肺癌细胞系(尤其是在腺癌中)中均特异上调表达;同时发现该抗原在正常肺成纤维细胞中主要是在细胞核中表达,而在肿瘤细胞中则发生了明显的转位。其转位模式与细胞病理类型密切相关,在肺腺癌中有相当一部分抗原转位至胞质,而肺鳞癌中仅小部分抗原从胞核转位至胞质。通过免疫组化检测,在患者肺癌组织中也发现相同的情况。活细胞免疫荧光实验及流式分析结果进一步证明,除胞质外,转位后的一部分靶抗原还表达于一定比例的肺癌细胞的膜表面,且在膜表面的表达强度与其转位的规律相类似,在肺腺癌细胞膜表面的表达明显强于肺鳞癌。与此转位规律一致,单克隆抗体 15A1 对于肺腺癌的体外抑制作用也强于对肺鳞癌的作用。肿瘤细胞中胞内蛋白转位已有不少的报道,如 HSP90<sup>[19]</sup>、GPR78<sup>[20]</sup>、Derlin-1<sup>[21]</sup>和 MSF<sup>[22]</sup>,并且这些转位后的蛋白在膜表面还被证明具有治疗靶标的潜力,然而像本研究发现的这样与细胞病理类型密切相关的转位还未见报道。本研究还证实了单克隆抗体 15A1 可在体内、外显著抑制人肺癌的生长,令人感兴趣的是单克隆抗体 15A1 的体内抑制效果要显著强于体外抑制效果。同时发现,在细胞膜表面表达单克隆抗体 15A1 靶抗原的肺癌细胞仅被抑制约 5%,推测可能单克隆抗体 15A1 是通过作用于对肿瘤生长极为重要的干细胞样细胞抑制体内肿瘤生长,因此其抑制效果需要在体内长时间作用方能显现出来。这些结果提示单克隆抗体 15A1 靶抗原在肺癌的发生或发展中具有较为重要的作用,显示出作为肺癌治疗靶标的较好前景。

目前肺癌仍然需要发现更多的靶向治疗分子靶标。本研究发现单克隆抗体 15A1 的靶抗原在肺癌细胞中可特异转位至胞质及细胞膜表面,且在多种

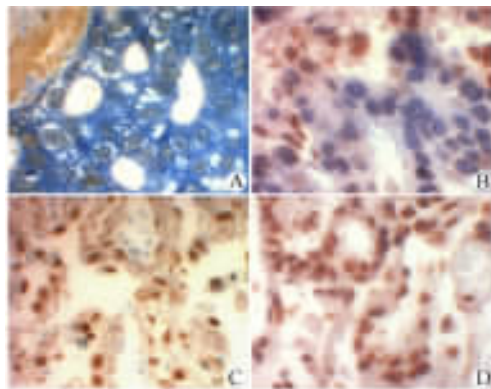


图 3 免疫组化检测单克隆抗体 15A1 靶抗原在肺癌组织中的表达(×400)

Fig. 3 Expression of 115A1 mAb targeting antigen in human lung cancer tissues as detected by immunohistochemistry(×400)

A: Lung adenocarcinoma; B: Lung squamous carcinoma; C, D: Negative and weakly positive paracancerous tissue

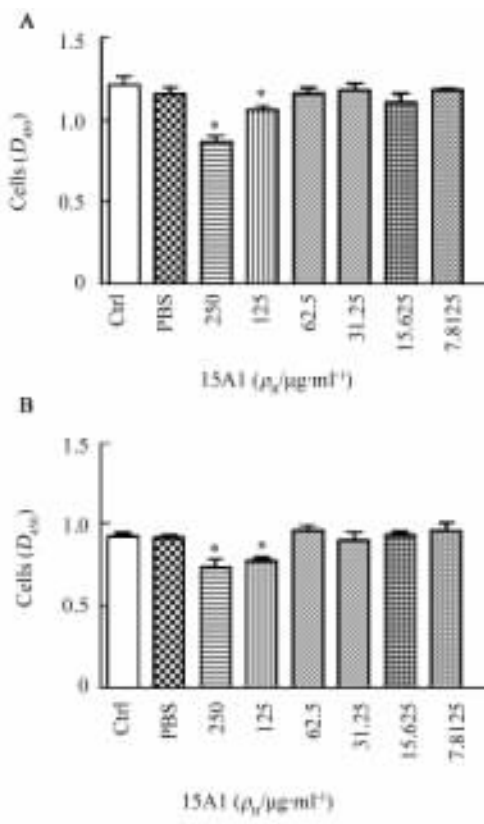


图 4 单克隆抗体 15A1 对肺癌细胞系增殖的抑制作用  
Fig. 4 Inhibitory effect of 15A1 mAb on proliferation of lung cancer cell lines

A: GLC-82 cells; B: GLC-P cells;

\*  $P < 0.05$  vs untreated cells group

肺癌细胞系和约75%的肺癌组织中特异上调表达,其抗体治疗可在体内外显著抑制人肺癌细胞的生长,这些结果强烈地提示了其靶抗原可能是一种新的肺癌靶向治疗候选靶标,分析鉴定该靶抗原蛋白将可能具有潜在的重要应用价值。同时,功能性单克隆抗体15A1的靶抗原在肿瘤细胞中的转位,尤其是与细胞病理类型密切相关地转位到细胞膜表面,也进一步提示在选择靶向治疗适宜患者的分子分型研究中,不仅需要关注靶蛋白的总体表达情况,可能还需要把更多的目光投向靶蛋白的转位及亚细胞定位表达的实际情况,以便更科学地选择适合于该靶点靶向治疗的患者。

[参考文献]

[1] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-2388.

[2] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 958-967.

[3] Bezzjak A, Tu D, Seymour L, et al. Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: Quality of life analysis of the national cancer institute of Canada clinical trials group study BR. 21 [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(24): 3831-3837.

[4] Lu JF, Eppler SM, Wolf J, et al. Clinical pharmacokinetics of erlotinib in patients with solid tumors and exposure-safety relationship in patients with non-small-cell lung cancers [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 80(2): 136-145.

[5] Gatzemeier U, von Pawel J, Vynnychenko I, et al. First-cycle rash and survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving cetuximab in combination with first-line chemotherapy: A subgroup analysis of data from the FLEX phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(1): 30-37.

[6] 马玲, 帕提古丽·阿尔西丁, 单利. 吉非替尼治疗化疗失败晚期非小细胞肺癌的临床观察 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(5): 554-558.

[7] 徐裕金, 郑晓. 放射治疗联合EGFR靶向抑制剂治疗晚期局部非小细胞肺癌的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(4): 478-483.

[8] Bang Y, Kwak EL, Shaw A, et al. Clinical activity of the oral ALK inhibitor PF-02341066 in ALK-positive patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J]. *J Clin Oncol*, 28: 18s. (suppl; abstr 3).

[9] Karp DD, Paz-Ares LG, Novello S, et al. Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751, 871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(15): 2516-2522.

[10] Soria JC, Shepherd FA, Douillard JY, et al. Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(10): 1674-1681.

[11] Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances [J]. *CA Cancer J Clin*. 2011 Feb 8. [Epub ahead of print]

[12] Hu H, Ran Y, Zhang Y, et al. Antibody library-based tumor endothelial cells surface proteomic functional screen reveals migration-stimulating factor as an anti-angiogenic target [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(4): 816-826.

[13] 胡海, 冉宇靓, 陈立钊, 等. 采用抗体库技术筛选抑制肺癌的功能性抗体 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(6): 395-398.

[14] 卢燕来, 冉宇靓, 遇珑, 等. 功能差异细胞模型筛选抗肺癌功能性单克隆抗体及其抗原 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(6): 501-507.

[15] 杨薇薇, 遇珑, 孙力超, 等. 识别肺癌上调表达的膜蛋白单克隆抗体抑制肺癌生长 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(7): 1586-1589.

[16] 王翠红, 孙立超, 孙立新, 等. 一株特异识别肺癌组织的单克隆抗体抑制肺腺癌的生长 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(5): 976-978.

[17] Palazzo A, Iacovelli R, Cortesi E. Past, present and future of targeted therapy in solid tumors [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(5): 433-461.

[18] Oh P, Li Y, Yu J, et al. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy [J]. *Nature*, 2004, 429(6992): 629-635.

[19] Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for HSP90 alpha in cancer cell invasiveness [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(6): 507-514.

[20] Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands [J]. *Cancer cell*, 2004, 6(3): 275-284.

[21] Ran Y, Hu H, Hu D, et al. Derlin-1 is overexpressed on the tumor cell surface and enables antibody-mediated tumor targeting therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20): 6538-6545.

[收稿日期] 2011-01-20 [修回日期] 2011-03-15

[本文编辑] 韩丹

