

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR



论文题目：AGR2 单克隆抗体联合他莫昔芬抑制肿瘤细胞的生长

学生姓名：_____ 陈昊

学生学号：_____ 5091719012

专 业：_____ 药学

指导教师：_____ 李大伟

学院(系)：_____ 药学院

AGR2 单克隆抗体联合他莫昔芬抑制肿瘤细胞的生长

摘要

肿瘤已经成为威胁人类的健康和生活质量的重要疾病之一。当前肿瘤治疗的现状是手段杂、数量多，但针对性不强，肿瘤细胞易产生耐药性。单克隆抗体药物治疗肿瘤有特异性强、副作用小等特点，联合用药具有解决化疗药物耐药性的优势，因此，有单克隆抗体参与的联合用药成为肿瘤治疗的发展趋势之一。他莫昔芬是常用化疗药物，能与雌激素受体竞争性结合，阻断雌激素的作用，抑制肿瘤生长，但肿瘤细胞也会产生耐药性。Anterior Gradient-2 (AGR2) 是一种在多种癌症中过量表达的蛋白质，与肿瘤的生长、迁移、对他莫昔芬的耐药性有密切的关系。18A4 是自主研制的 AGR2 单克隆抗体。本研究测定了 18A4 的浓度、纯度和表观亲和力，证明了从小鼠腹水中纯化能获得更高浓度的抗体，并将 18A4 的质量标准与已上市同类药物进行比较。本研究发现 18A4 与他莫昔芬联用能够抑制乳腺癌细胞 MCF-7 和卵巢癌细胞 SKOV-3 的生长，抑制作用的出现与他莫昔芬的浓度有关。18A4 与他莫昔芬对肿瘤细胞药效的交叉影响较小，确保联合用药的安全性。联合用药抑制肿瘤细胞生长可能有多种机制，18A4 增强他莫昔芬对肿瘤细胞周期的阻滞可能是其中之一。本研究将直接推动 18A4 质量标准的建立，催生一系列 AGR2 单克隆抗体与化疗药物组成的新型抗肿瘤药物组合，具有重要的意义。

关键词：AGR2，单克隆抗体，他莫昔芬，联合用药，肿瘤细胞生长

THE COMBINATION OF MONOCLONAL ANTIBODY TARGETING AGR2 AND TAMOXIFEN INHIBITS HUMAN CARCINOMA CELL PROLIFERATION

ABSTRACT

Cancer is one of the most important diseases threatening human's health. Currently, there are several kinds of therapies used in cancer treatments. However, those therapies have their own limitations. For an instance, their lack of specificity may lead to drug-resistance of cancer cells. Fortunately, some new strategies can overcome these drawbacks in cancer treatments. Monoclonal antibody has higher specificity and fewer side-effects. Combination therapy can reduce potential drug-resistance. As a result, combination therapy involving monoclonal antibody is becoming a new trend in the development of future cancer therapeutics. Tamoxifen is a traditional anti-cancer drug. It binds to the estrogen receptor competitively, blocking the function of estrogen and inhibits cancer cell growth. Some cancer cells may acquire Tamoxifen-resistance after a period of treatments. Anterior Gradient-2 (AGR2) is a protein over-expressed in several kinds of cancer cells. Over-expression of AGR2 is closely related to cancer proliferation, metastasis and Tamoxifen-resistance. 18A4 is an in-house patented monoclonal antibody targeting AGR2. This research reported the concentration, purity and apparent affinity of 18A4. Based on these data, murine ascites was a better source to prepare 18A4 with higher concentration. Moreover, the combination of 18A4 and Tamoxifen could inhibit proliferation of human breast cancer cell MCF-7 and human ovarian cancer cell SKOV-3. The inhibition effects were related to the concentration of Tamoxifen. Furthermore, 18A4 increasing cell cycle inhibition of Tamoxifen was one of the mechanisms in this combination therapy, as cell cycle distribution of cancer cells increased in G0-G1 phase 18 hours after treatment. This research will promote the establishment of the quality criterion of 18A4, as well as a series of combination anti-cancer therapies involving monoclonal antibody targeting AGR2 and chemical drugs.

Key words: AGR2, monoclonal antibody, Tamoxifen, combination therapy, carcinoma cell proliferation

目 录

第一章 绪论-----	1
1.1 肿瘤的疾病特点-----	1
1.1.1 肿瘤在临床表现上的特点-----	1
1.1.2 肿瘤在内在属性上的特点-----	2
1.2 肿瘤的治疗现状和发展趋势-----	2
1.2.1 肿瘤的治疗现状-----	2
1.2.2 靶向治疗和单克隆抗体药物-----	3
1.2.3 联合用药是肿瘤治疗的发展趋势之一-----	3
1.3 AGR2 在肿瘤研究和治疗中的作用-----	3
1.3.1 AGR2 (Anterior gradient-2) 的简介-----	3
1.3.2 AGR2 的结构和生物学功能-----	4
1.3.3 AGR2 单克隆抗体 18A4-----	5
1.4 他莫昔芬的优势和不足-----	5
1.4.1 他莫昔芬的简介-----	5
1.4.2 他莫昔芬对肿瘤细胞作用的研究现状-----	5
1.4.3 他莫昔芬与肿瘤耐药性-----	6
1.5 单克隆抗体与他莫昔芬联用的研究现状-----	7
1.5.1 他莫昔芬与 HER-2 单克隆抗体的联用-----	7
1.5.2 他莫昔芬与 IGFR 单克隆抗体的联用-----	8
1.5.3 AGR2 单克隆抗体有望与他莫昔芬组成新型抗肿瘤候选药物-----	8
1.6 课题的选题意义和研究内容-----	8
第二章 材料与方法-----	9
2.1 研究材料-----	9
2.1.1 细胞株-----	9
2.1.2 主要仪器设备-----	9
2.1.3 主要试剂-----	9
2.1.4 实验动物-----	10
2.2 研究方法-----	10
2.2.1 单克隆抗体 18A4 的制备-----	10
2.2.2 单克隆抗体 18A4 的纯化-----	10
2.2.3 免疫印迹法测定小鼠腹水对 18A4 抗体富集作用 -----	10
2.2.4 单克隆抗体 18A4 的浓度测定-----	11
2.2.4.1 考马斯亮蓝 G250 法-----	11
2.2.4.2 SDS-PAGE 法 -----	11
2.2.5 单克隆抗体 18A4 的表观亲和力的测定-----	12
2.2.5.1 抗原 AGR2-MBP 融合蛋白的制备和纯化 -----	12
2.2.5.2 非竞争性 ELISA 法 -----	12

2.2.5.3 竞争性 ELISA 法	13
2.2.6 MTT 法检测单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤细胞 MCF-7 和 SKOV-3 生长的影响	13
2.2.6.1 实验用他莫昔芬溶液的制备	13
2.2.6.2 MTT 实验	13
2.2.7 单克隆抗体 18A4 和他莫昔芬的药物交叉作用实验	14
2.2.8 流式细胞仪检测单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期的影响	14
2.3 本章小结	15
第三章 结果与分析	16
3.1 单克隆抗体 18A4 的浓度和表观亲和力	16
3.1.1 纯化后单克隆抗体 18A4 的浓度	16
3.1.1.1 考马斯亮蓝 G250 法	16
3.1.1.2 SDS-PAGE 法	17
3.1.2 用小鼠腹水进行亲和纯化能获得更高浓度的抗体	17
3.1.3 单克隆抗体 18A4 的表观亲和力	18
3.1.3.1 与同浓度的抗原结合的能力——非竞争性 ELISA 法	18
3.1.3.2 与不同浓度抗原的结合能力——竞争性 ELISA 法	19
3.2 单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用抑制肿瘤细胞的生长	20
3.2.1 乳腺癌细胞 MCF-7 对 18A4 和他莫昔芬均敏感	20
3.2.2 18A4 与他莫昔芬联用在他莫昔芬低浓度时增强对 MCF-7 生长抑制	21
3.2.3 18A4 和他莫昔芬对 MCF-7 的生长抑制作用没有交叉影响	22
3.2.4 卵巢癌细胞 SKOV-3 对 18A4 和他莫昔芬均不敏感	22
3.2.5 18A4 与他莫昔芬联用在他莫昔芬高浓度时增强对 SKOV-3 生长抑制	24
3.3 单克隆抗体 18A4 增强他莫昔芬对 MCF-7 细胞周期阻滞作用	25
3.4 本章小结	29
第四章 讨论	30
4.1 单克隆抗体 18A4 的质量标准日趋完善	30
4.2 18A4 与他莫昔芬的联用抑制了肿瘤细胞的生长	31
4.2.1 细胞选择性	31
4.2.2 浓度选择性	31
4.2.3 交叉影响低	31
4.3 18A4 增强了他莫昔芬的细胞周期阻滞可能成为联合用药抑制肿瘤细胞生长的机制	32
4.3.1 细胞周期阻滞的增强呈现时间相关性	32
4.3.2 联合用药抑制肿瘤生长可能存在其他机制	32
4.4 18A4 与他莫昔芬联合成为新型抗肿瘤候选药物的前景展望	32
4.5 本章小结	32
第五章 结论	33
参考文献	34
谢辞	39

第一章 绪论

在人类与疾病斗争的历史上，对抗肿瘤的“战役”始终持续着。从基础研究到临床的诊断和治疗，在肿瘤研究的各个领域，不断地产生着突破性的进展，如 Folkman Judah 发现的新生血管的形成对肿瘤的生长和转移有着重要的作用^[1]、用微阵列分析(Microarray Analysis)等分子生物学手段在基因水平进行肿瘤诊断^[2]、紫杉醇(Paclitaxel)等天然药物被用于肿瘤的临床治疗^[3]等。这些进展都推动着新一代抗肿瘤药物或肿瘤诊断方法的研究和开发，具有里程碑式的意义。

但是，由于肿瘤有着特殊的疾病特点和复杂的发生、发展机制，目前在治疗上还有很多难点，如传统化疗药物的毒副作用、肿瘤产生耐药性等。针对以上问题，出现了靶向治疗、联合用药治疗等新理念。在这些新理念指导下，必将催生出一系列的新型抗肿瘤候选药物。因此，如何建立合理的指标去评价新型抗肿瘤候选药物的活性，并探究其药理学机制有着重要的意义。

1.1 肿瘤的疾病特点

肿瘤是有机体的某一部分组织细胞长期不正常地增生所形成的新生生物，分为良性肿瘤和恶性肿瘤。20世纪以来，肿瘤逐渐成为了威胁人类生命健康和生活质量的重要疾病之一。

1.1.1 肿瘤在临床表现上的特点

肿瘤对于人类健康的威胁可以体现在高病死率、高发病率和生活质量的急剧下降三个方面，这就是肿瘤在临床表现上的疾病特点。

(1) 高病死率

肿瘤具有较高的病死率。据统计，全世界每年每 100,000 人中，就有 100-350 人死于肿瘤^[4]，其中肺癌、肝癌等恶性肿瘤有着很高的病死率。虽然手术、药物等治疗手段有效延长了病人的生命，但是由于肿瘤不易早期诊断、治疗费用高昂、医疗条件有限等因素，在某些条件下，肿瘤仍然与死亡划上等号。“谈癌色变”仍然是人们心中挥之不去的阴影。

(2) 高发病率和复杂的分布

肿瘤在人群中具有较高的发病率，分布不均匀，受到多种复杂因素的影响。仅在刚过去的 2012 年，美国的肿瘤新增发病人数就有 1638910 例，其中病死的有 577190 例^[5]。纵观全球，在 1990 年至 2000 年的十年间，全球癌症的发病及死亡增长了约 22%^[6]，并且世界各地的发病率差异较大。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 在 2000 年预测，2020 年每年癌症的新发病例数将达到 2000 万^[7]，成为全球的重要公共卫生问题之一。另外，肿瘤的发病率还与年龄、性别、是否吸烟、饮食习惯等多种因素有关，有着复杂的流行病学分布，难以进行全面的预防和干预。

(3) 病人生活质量的急剧下降

肿瘤带来的各种并发症严重影响患者的治疗和生存质量。例如癌症引起的剧烈疼痛，每天世界上约有 350 万人承受这种煎熬^[8]，许多肿瘤患者不得不使用吗啡等强效镇痛药。在 1998 年进行的一项对 255 名肿瘤患者的抽样调查表明，肿瘤患者在日常感受、身体机能和情感社交三方面的得分均低于正常人^[9]。

因此，在制定肿瘤治疗方案时，过去只关注病人的生存率，现在还要将病人的生活质量

纳入评价治疗方案是否合理的体系中。临幊上出现了质量调整生命年（quality adjusted life years, QALYs）等评价治疗效果的指标，成为了肿瘤治疗的药物经济学的研究热点^[10]。从单纯追求病人生存率到关注病人生活质量的变化，足以体现肿瘤对病人生活质量的影响。

1.1.2 肿瘤的内在属性上的特点

如果说上一节提到的肿瘤的临幊表现是从宏观上观察肿瘤，那么本节的肿瘤的内在属性上的特点则是从微观的角度剖析肿瘤。肿瘤的内在属性主要在于复杂多样的机制和难以治疗的顽固性。

(1) 复杂多样的机制

相对于其他疾病，肿瘤有着复杂多样的机制。从表面上看，肿瘤细胞具有侵袭性生长、无限增值和无接触抑制的三个不同于正常细胞的特点^[11]。但是在这简单的表面现象之后，却有着如特大城市地图一般的信号通路进行着调控；肿瘤细胞又有着许多分型，各种蛋白的表达量和对药物的敏感程度不尽相同。

如此复杂多样的机制说明了肿瘤是一个“生命体”，肿瘤干细胞（Cancer Stem Cells）的发现更证实了这一点。根据 Reya Tannishtha 等的报道，肿瘤通常源于干细胞的转化，肿瘤细胞中可能包括肿瘤干细胞，相似的信号传导通路可能调节肿瘤干细胞和肿瘤细胞的自我更新^[12]。因此，现在所了解的肿瘤的发生、发展机制可能只是这些机制中的冰山一角，对于这个失去控制的“生命体”，人类需要更多的时间去研究。

(2) 难以治疗

肿瘤的机制复杂多样的内在属性决定了其难以治疗的特点。四十多年前，前总统尼克松领导下的美国政府已经意识到了在国家层面推动抗击肿瘤的研究的重要性，并在 1971 年通过了国家癌症法案（National Cancer Act），计划近期攻克癌症，但是事与愿违^[13]。肿瘤的治疗也经过了单纯的化疗药物治疗，到手术、放射疗法等物理的治疗手段，再到联合用药治疗等多个阶段。但是每个阶段中都存在着病人耐受性差、个体差异大、难以根治的特点。

基于上述肿瘤的临幊特点和内在属性，研究和开发治疗肿瘤，特别是恶性肿瘤的创新药物或治疗手段已经成为了生物医药研究领域的热点，具有重要的意义。

1.2 肿瘤的治疗现状和发展趋势

肿瘤具有高病死率、高发病率、病人生活质量急剧下降的临幊特点，又有着复杂多样的机制，在治疗上有相当的难度。尽管如此，人类对于肿瘤已经有了一些治疗武器，除去手术治疗，可选择的药物治疗方案的数量与日俱增。如何趋利避害，获得更好的肿瘤药物治疗方案，了解肿瘤治疗的现状、追踪肿瘤药物治疗的发展趋势是必不可少的。

1.2.1 肿瘤的治疗现状

肿瘤的治疗现状用一个字形容就是“杂”，这包含着两层意思，首先是肿瘤治疗的方案的类型多，其次是每种类型下的治疗方案数量多。Hanahan Douglas 等在 2000 年总结了肿瘤发生、发展的 6 种途径（Six Hallmarks），分别为持续的增殖信号、无视生长抑制作用、新生血管形成、减少细胞死亡、无限繁殖、侵袭正常组织获得生长空间^[14]。这些途径在 2011 年被补充为两个方面，分别为物质上的新生和功能上的启动，每个方面共有 5 种途径^[15]。可见，肿瘤复杂多样的机制决定了治疗方案的数量和分类，每种机制对应着几种治疗方案。因此，在制定肿瘤治疗方案时，增加新的治疗手段，或者将现有的治疗手段更好地组合运用成为了关键。

肿瘤治疗手段的类型、数量庞大，医生们在此“杂”的武器中选择一件或几件称手的“武器”去对付肿瘤，就是肿瘤治疗的现状。

1. 2. 2 靶向治疗和单克隆抗体药物

靶向治疗的概念起始于德国科学家 Ehrlich Pual 提出的“神奇子弹”(magic bullet) 的构想^[16]，原先是指将毒素特异性导入细菌并杀伤细菌的设想，现在指针对特定疾病的靶点，设计和构建靶向制剂用于治疗。目前，具有靶向作用的药物有单克隆抗体、化学小分子药物等多种类别。

与传统化学治疗相比，单克隆抗体药物能够与肿瘤组织、肿瘤细胞的特定靶点识别，具有特异性肿瘤杀伤效果，副作用小，并且在一些类型的肿瘤治疗上已取得了较好的疗效，是良好的实现靶向治疗的药物。

单克隆抗体药物发展迅速，自 1986 年第一个治疗性单克隆抗体药物被 FDA 批准上市以来，在美国已经有 21 个单克隆抗体药物走向市场，在美国之外有更多的单克隆抗体药物上市，并有 200 多个候选药物在各阶段的临床试验中^[17]，著名的有 Roche 公司的 Avastin、Rituximab、Herceptin 等。单克隆抗体药物有着广阔的市场前景，2006 年全球的单克隆抗体药物销售额达到 206 亿美元，其中不乏重磅炸弹（blockbuster），如 Rituximab 在 2006 年的全球销售额为 47 亿美元，占了总销售额的四分之一^[18]。

因此，研制新型单克隆抗体的抗肿瘤药物并明确其作用机制，已成为目前抗肿瘤药物研究的热点，这也是肿瘤治疗的发展方向之一。

1. 2. 3 联合用药是肿瘤治疗的发展趋势之一

肿瘤治疗中的联合用药最初是指将几种化疗药物相结合，以增加细胞毒性的作用，因此同时被称作联合化学疗法（Combination Chemotherapy）^[19]。在过去，合理的联合用药是将作用机制不同的几种化疗药物联合在一起，这样不仅能克服肿瘤可能产生的耐药性，还因为每种药物的剂量减小，从而在不降低疗效的基础上增加了病人的耐受度。

但是如今的联合用药的概念已经得到了扩展，或者说进入了下一个时代。联合用药已经不再只是化学药物的简单组合。更多机制新颖的不同类别的药物加入进来，如细胞因子、多肽、免疫调节剂等，其中包括单克隆抗体。这些药物可能本身没有化疗药物那么强的药效，但是由于其独特的机制，可能正好阻断了肿瘤产生耐药性的通路、可能与化疗药物有协同作用、可能对肿瘤细胞周期有调节，能发挥事半功倍的作用。

这些药物可以统称为生物疗法（Biological Therapy）或免疫疗法（Immunotherapy），它们正越来越多地参与到肿瘤的联合用药治疗中^[20]，成为肿瘤治疗的发展趋势之一。

综上所述，单克隆抗体有着靶向治疗的优势，有着广阔的市场前景，同时属于免疫疗法，与化学药物联用已经成为肿瘤治疗领域的研究热点。因此，开发单克隆抗体药物与传统化学药物联合用药的新型抗肿瘤药物组合符合现代肿瘤治疗的需要和发展趋势，具有重要的意义。

1. 3 AGR2 在肿瘤研究和治疗中的作用

1. 3. 1 AGR2 (Anterior gradient-2) 的简介

人前梯度蛋白(Human anterior gradient-2, HAG-2, AGR2)是一种蛋白质的二硫键异构酶，在多种细胞的生长、发育中起着重要的调节作用，可能与慢性肠道炎症^[21]、肿瘤等疾病有关。

AGR2 是首先在 1998 年由 Kuang W. 等在表达雌激素受体 (Estrogen Receptor, ER) 的人乳腺癌细胞株中，通过比较筛选发现的一种生物学标记蛋白（biomarker）^[22]，同年由 Thompson A. 和 Weigel J. 通过分子生物学方法得到全长的 cDNA (complement DNA) 克隆^[23]，比较后发现其与非洲爪蟾的前梯度蛋白 (Xenopus anterior gradient, XAG-2) 同源，功能与

蟾蜍的发育有关，并命名为 AGR2。2000 年，Petek E 等通过荧光原位杂交技术确定了 AGR2 的基因位于人染色体的 7p21.3 位置^[24]。虽然人类的 AGR2 蛋白是 XAG-2 的同源物，但是与 XAG-2 不同的是，人的 AGR2 蛋白主要分布在由内胚层分化出的气管、肺部、胃部、结肠等部位^[25]，可见 AGR2 在人的正常组织发育中起着某些作用。

综上所述，AGR2 在正常组织中也有表达，但在肿瘤细胞中是一个更高度表达的分泌蛋白。其生物学功能是能扰乱正常细胞的生长，促进肿瘤的形成、生长与转移，其还可能与多种肿瘤细胞的耐药性相关。因此，在肿瘤组织与正常组织中表达量的差异、与肿瘤的发生发展有关的生物学功能决定了 AGR2 作为治疗靶标的潜在可能。

1. 3. 2 AGR2 的结构和生物学功能

Myung JK. 等在 2008 年报道了用 MALDI-TOF/TOF 的二级质谱 (MS/MS) 的方法对 AGR2 蛋白进行了测序^[26]，检测结果说明 175 个氨基酸残基组成了 AGR2 的一级结构。2013 年 3 月，Patel Pryank 等报道了用核磁共振对 AGR2 蛋白的高级结构的最新研究成果，AGR2 在二级结构上具有二聚的硫氧还原蛋白的折叠结构 (Dimeric Thioredoxin Fold Structure)^[27]，有四个 α 螺旋 (α -helix) 和四个 β 片层 (β -sheet) 的结构，并与细胞粘附有关。

AGR2 的蛋白结构的已知功能区域中，前 20 个氨基酸为分泌肽、81-84 位是 AGR2 作为蛋白二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 的活性位点^[28]、最后 4 个氨基酸残基 KTEL 为内质网滞留信号^[29]，AGR2 的一级结构和模拟的二级结构折叠方式，AGR2 的一级结构、活性位点、二级结构折叠方式等如图 1-1 所示。值得注意的是，AGR2 具有的蛋白二硫键异构酶活性位点 “CXXS” (其中 X 为任意氨基酸) 与正常的 PDI 位点 “CXXC” 有所区别，研究表明“CXXS”活性位点具有重排二硫键的功能，但缺失二硫键合成功能^[28]，AGR2 对蛋白质二硫键的不可逆重排可能是导致其扰乱正常细胞生长的机制。



图 1-1 AGR2 的一级结构、二级结构和相应的活性位点
(序列上方的灰色线代表二级结构，序列下方的文字为活性位点名称)

AGR2 在肿瘤中的生物学功能已经日渐清晰，作用研究也逐渐成为研究热点。研究表明，AGR2 在乳腺癌^[30, 31]、前列腺癌^[32-34]、肺癌^[35, 36]、胃癌^[37]等肿瘤中都有超量表达，只是程度不同，近年来 AGR2 在肝癌细胞中也有超量表达的报道^[38]。AGR2 基因的表达与肿瘤的生长、分化、转移性侵袭和预后等均有重要的作用，AGR2 蛋白主要可以促进肿瘤细胞的生长^[39]和迁移^[40]，并且与部分肿瘤的耐药性有关^[31, 41]。

有关 AGR2 生物学功能的信号转导通路有多种猜测。在细胞外，AGR2 作为一种分泌蛋白，可能与细胞膜表面的 C4.4A^[42]、DAG1、CD59 等受体结合，抑制肿瘤细胞的凋亡。在细胞内，AGR2 的功能上游可能受到芳香烃受体（aromatic hydrocarbon receptor, AhR）的调控^[43]，影响 p53 基因的表达^[44]，同时 AGR2 的表达也与内质网应激（Endoplasmic Reticulum stress, ER stress）在炎症的形成的发展中有着密切关系^[45, 46]。AGR2 的下游信号与多条信号通路有关，如周期素 D (cyclin D)、雌激素受体-α (Estrogen receptor-α)、survivin 等^[47]，从而影响促进肿瘤的生长和转移。

综上所述，AGR2 是可以分泌到胞外的、具有促进肿瘤生长和转移的活性的蛋白，为肿瘤治疗的潜在靶标。同时，AGR2 的信号通路错综复杂，又与肿瘤耐药性有关，显示了 AGR2 单克隆抗体与化疗药物进行联合用药组成新型抗肿瘤候选药物的可能性。

1. 3. 3 AGR2 单克隆抗体 18A4

18A4 是本实验室研制的靶向 AGR2 的单克隆抗体，并获专利证书。2010 年，本实验室的武正华等报道了 18A4 的制备、鉴定的方法和初步的抗肿瘤活性^[48]，为研究和开发新型抗肿瘤候选药物组合创造了有利条件。

1. 4 他莫昔芬的优势和不足

1. 4. 1 他莫昔芬 (Tamoxifen) 的简介

他莫昔芬 (Tamoxifen) 的化学名称为三苯氧胺，一般为枸橼酸盐的白色粉末状固体，主要用于乳腺癌、卵巢癌的治疗。他莫昔芬的溶解性不佳，难溶于水，易溶于二甲亚砜、无水乙醇等，因此制剂上常制成肠溶衣片。

他莫昔芬是在 1966 年由 Richardson Dora 首先合成的，研究中的名称为 ICI-46,474，后来才定名为他莫昔芬^[49]。他莫昔芬本来是为了避孕药的研究而开发的，但是由于雌激素与乳腺癌的发生、发展有着很多联系，逐渐用在了乳腺癌的治疗上。首次临床试验在 1971 年进行，对于中晚期的乳腺癌病人取得了令人满意的疗效。1977 年，他莫昔芬正式被美国 FDA (Food and Drug Administration) 批准上市。仅在三年之后的 1980 年，他莫昔芬与其他化疗药物的联合用药治疗乳腺癌在临床开始试验，并在 1983 年由 Baum Michael 报道了临床试验结果^[50]，结果说明了他莫昔芬运用于肿瘤联合疗法的可能。

1. 4. 2 他莫昔芬对肿瘤细胞作用的研究现状

他莫昔芬是一种非甾体的选择性雌激素受体调节剂 (Selective Estrogen Receptor Modulator, SERM)，同时他莫昔芬是一种前药 (Prodrug)，是通过其活性代谢产物——4-羟基他莫昔芬在乳腺组织中起到雌激素受体拮抗剂的作用^[51]，他莫昔芬的体内活化主要依靠 CYP 2D6 等多种肝药酶的一相代谢作用^[52]，如图 1-2 所示。

他莫昔芬能治疗肿瘤，是因为一些乳腺癌细胞，如 MCF-7 细胞需要雌激素才能生长，雌激素结合并激活雌激素受体，促进了肿瘤细胞的生长。他莫昔芬的代谢产物与雌激素受体结合，但没有激活它。由于这种竞争性的拮抗作用，他莫昔芬阻止了雌激素与其受体的结合，因此抑制了乳腺癌细胞的生长。基于以上机制，他莫昔芬是目前用于早期和中晚期的雌激素受体阳性 (Estrogen Receptor Positive, ER+) 妇女的乳腺癌的治疗。

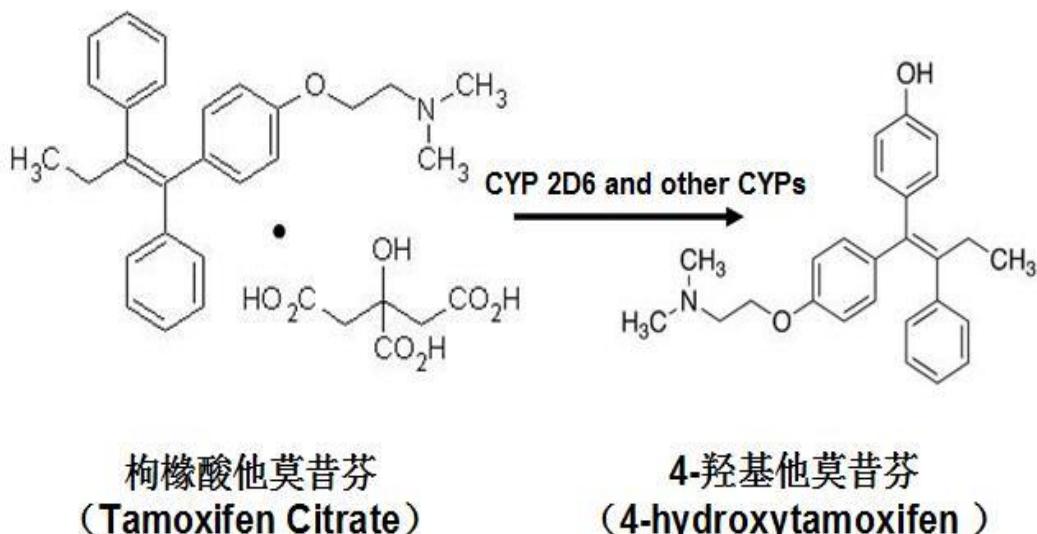


图 1-2 枸橼酸他莫昔芬在肝药酶的作用下在体内活化为 4-羟基他莫昔芬

他莫昔芬对于雌激素受体的调节作用的机制主要有形成核复合物阻止细胞的 DNA 合成和细胞周期阻滞作用。据研究，他莫昔芬作用于乳腺癌细胞 MCF-7 在 16-24 小时即可产生明显的 G0-G1 期的增加，从而抑制肿瘤细胞的分裂^[53, 54]。从机制上看，他莫昔芬是抑制肿瘤生长的，而不是单纯地杀死肿瘤细胞，具有较小的细胞毒性。

1. 4. 3 他莫昔芬与肿瘤耐药性

虽然他莫昔芬针对乳腺癌等有着良好的疗效，但是肿瘤逐渐产生了耐药性，这种现象也被后续的实验室研究所证实。1981 年，Nawata H. 等运用软琼脂克隆形成的方法筛选出了具有他莫昔芬抗性的 MCF-7 细胞株，并命名为 R27^[55]。

肿瘤细胞对他莫昔芬产生耐药性的机制有多种说法，是目前的研究热点。雌激素受体的结构可能是产生耐药性的原因之一，Connor Caroline 等在 2001 年报道了使用抗雌激素（Antiestrogen）GW5638 会使雌激素受体的构型产生变化，使对他莫昔芬耐药的乳腺癌细胞重新变得敏感^[56]。肿瘤细胞改变他莫昔芬的浓度和结构也可以产生耐药性，1991 年 Osborne C.K. 就报道了他莫昔芬浓度的降低和 4-羟基他莫昔芬的异构化是获得性耐药性的机制^[57]。信号通路的改变有更多的说法，但总体可以分为两类。

(1) 与肿瘤发生发展有关的信号通路

目前研究的肿瘤信号通路中，与他莫昔芬的耐药性有关的有 HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) 的上调、p53 基因的表达^[58]和相关的 AKT/mTOR 信号通路^[59]，蛋白激酶 A (Protein Kinase A, PKA) 的 305 位丝氨酸磷酸化^[60]，周期素 (cyclin D1, CCND1) 和 PAK1 (p-21-activated Kinase 1) 基因表达的增加^[61]等。特别要提出的是，Hrstka R 等在 2010 年报道了他莫昔芬能够刺激乳腺癌细胞 MCF-7 中 AGR2 的表达，获得耐药性，提示了 AGR2 与他莫昔芬的耐药性有关^[62]。

针对 HER-2 受体的上调使肿瘤细胞产生耐药性，目前已经有靶向 HER-2 的单克隆抗体与他莫昔芬联用进行肿瘤联合治疗的报道，已经在进行临床试验^[63]。针对 AKT/mTOR 信号通路和耐药细胞表现出的转移和侵袭性增强的特点，已经有吉非替尼 (Gefitinib) 与他莫昔芬联用以克服耐药性的报道^[59, 64]。

(2) 与正常细胞生长有关的信号通路

他莫昔芬的耐药性也受到与正常细胞生长有关的信号通路的调控。生长因子受体 (growth factor receptor) 的调控作用是主要的研究热点。

1992 年, Long B. 等就发现上皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 的构型改变和与配体的结合能力影响肿瘤细胞对他莫昔芬的敏感性^[65], 其机制在 2006 年由 Riggins R.B. 等进行了补充, 指出了他莫昔芬诱导的 Cas 的过量表达引起了 c-Src 的酪氨酸激酶活性的上调, 使得 EGFR 的 845 位酪氨酸磷酸化增强, 改变了 EGFR 的构型, 导致肿瘤的耐药性^[66]。胰岛素类似的生长因子受体 (Insulin-like Growth Factor, IGFR) 的缺失也和肿瘤耐药性有关, 并已经有 IGFR 相关抗体与他莫昔芬联用的报道^[67, 68]。

综上所述, 他莫昔芬与肿瘤耐药性的是有关的, 其机制十分复杂, AGR2 也是其中重要的一个环节, 并与其他信号通路有着密切联系, 针对他莫昔芬诱导的肿瘤耐药性, 已经有联合用药的相关研究, 如图 1-3 所示。

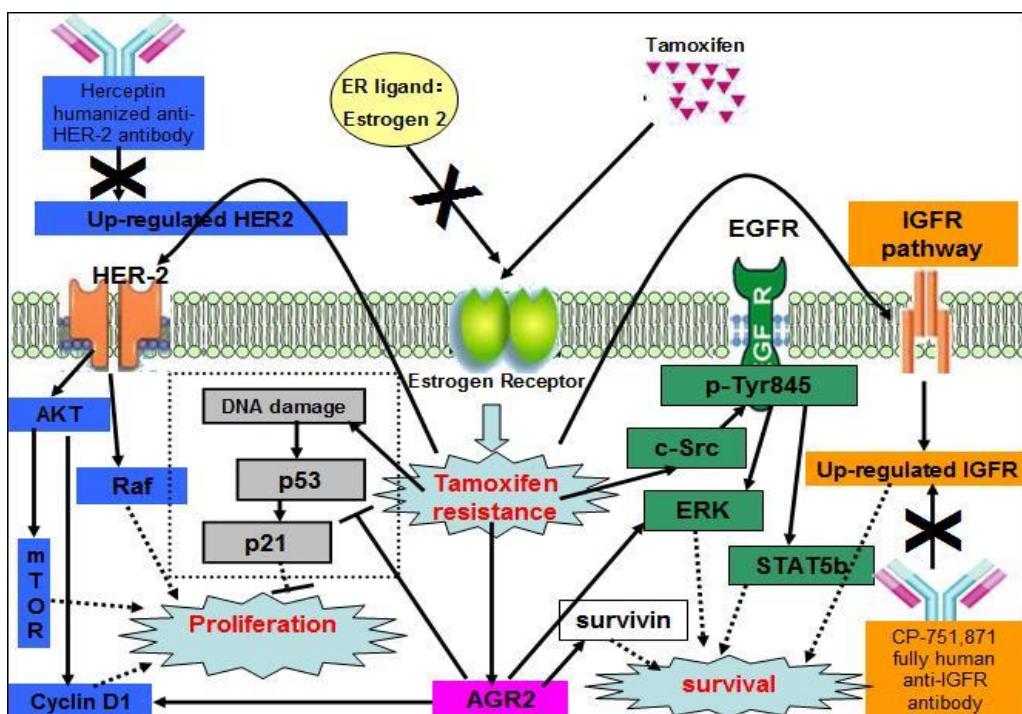


图 1-3 他莫昔芬引起的肿瘤耐药性的部分机制中 AGR2 的位置和现有的联合疗法
(图中黄色的部分代表有关 IGFR 的机制, 绿色的部分代表有关 EGFR 的机制, 蓝色的部分代表有关 HER-2 的机制, 灰色部分代表细胞核内的基因表达, 虚线箭头代表省略部分通路)

1.5 单克隆抗体与他莫昔芬联用的研究现状

针对他莫昔芬的肿瘤耐药性, 目前已经出现了靶向 HER-2 的单克隆抗体、靶向 IGFR 的单克隆抗体和吉非替尼等药物与他莫昔芬组成联合疗法的报道。

1.5.1 他莫昔芬与 HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) 单克隆抗体的联用

由于 HER-2 受体的上调在他莫昔芬诱导的肿瘤耐药性的机制中占有重要的位置, 通过单克隆抗体特异性地阻断 HER-2 受体理论上可以消除部分的耐药性。

1997 年, Witters L.M. 等就报道了抗 HER-2 受体的单克隆抗体 4D5 联合他莫昔芬增强了对肿瘤细胞生长的抑制作用^[69]。4D5 单克隆抗体就是日后商品名称为赫赛汀 (Herceptin) 的曲妥珠单抗 (Trastuzumab)。2004 年, Argiris A. 等报道了他莫昔芬与赫赛汀联用能够增强抑制肿瘤细胞生长的作用, 并使更多的肿瘤细胞停滞在 G0-G1 期^[70]。2005 年, Wang C.X. 等对他莫昔芬与赫赛汀联用的体内、体外的药效和相应机制进行了进一步的研究, 得出了赫赛汀抑制了 HER-2 下游的 MAPK/AKT 通路, 从而使得联合疗法在体外对于乳腺癌细胞 BT-474 的作用增强, 在体内对小鼠肿瘤模型的生长也有抑制作用^[71]。

1.5.2 他莫昔芬与 IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor) 单克隆抗体的联用

肿瘤对他莫昔芬的耐药性产生也与 IGFR 有关, 但是有关这个靶点的抗体药物与他莫昔芬联用的报道较少, 有 2005 年 Cohen B.D. 等报道的 CP-751,871 单克隆抗体^[72]。从这项研究中, 可以注意到以下两点。

显而易见的是, CP-751,871 是通过转基因小鼠技术 (XenoMouse technology) 获得的全人抗体, 相对于赫赛汀等人源化抗体有更小的免疫原性, 指示了单克隆抗体药物的发展方向。更令人兴奋的是, 他莫昔芬与单克隆抗体药物联合用药的研究并没有因为有上市的赫赛汀的出现而停止脚步, 相反, 出现了靶向 IGFR 的单克隆抗体等机制完全不同的他莫昔芬补充疗法。这指示了分析信号通路寻找新的补充疗法的可行性。

1.5.3 AGR2 单克隆抗体有望与他莫昔芬组成新型抗肿瘤候选药物

通过他莫昔芬的肿瘤耐药性机制的研究, 目前已经有几类药物通过不同的途径对他莫昔芬的耐药性进行克服, 但是这种克服是不全面的, 肿瘤细胞总能找到代偿途径重新获得耐药性, 所以继续寻找他莫昔芬的补充药物是有必要的。而且, CP-751,871 单克隆抗体的出现说明了分析信号通路寻找新的补充疗法是可行的。

分析他莫昔芬引起的肿瘤耐药性的部分机制中 AGR2 的位置 (如图 1-3 所示), 他莫昔芬的耐药性与 AGR2 在较下游的位置有关, 在信号通路上 AGR2 与其他因子、受体有交互作用, 这两点提示了 AGR2 单克隆抗体与他莫昔芬组成新型抗肿瘤候选药物的可能性。

1.6 课题的选题意义和研究内容

本课题对单克隆抗体 18A4 和化疗药物他莫昔芬组成的新型抗肿瘤候选药物组合的抑制肿瘤生长的作用和部分机制进行的研究, 能够验证 AGR2 作为增强肿瘤对他莫昔芬的敏感性的候选靶点, 18A4 与他莫昔芬的联合运用应用将催生一系列 AGR2 单克隆抗体与传统化疗药物, 具有重要的意义。

本课题需要研究单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤生长的抑制作用和相关的药理学机制。主要研究内容是通过小鼠腹水纯化单克隆抗体 18A4, 证明从腹水中纯化抗体的优势, 对抗体的浓度、表观亲和力等进行鉴定, 尝试建立 18A4 的初步质量标准; 通过对卵巢癌细胞 SKOV-3 和乳腺癌细胞 MCF-7 的体外实验, 从细胞水平阐明 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤细胞生长的影响; 在药理学机制上, 通过流式细胞技术对细胞周期的检测说明 18A4 与他莫昔芬联用对乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期的影响。

本课题预期通过对 18A4 和他莫昔芬联用产生的抗肿瘤作用和可能机制的研究, 获得 18A4 与传统化疗药物联用组成的新型抗肿瘤候选药物组合的初步临床前研究数据。

第二章 材料与方法

2.1 研究材料

2.1.1 细胞株

18A4 杂交瘤细胞（本室制备保存）

MCF7 (human breast adenocarcinoma cell line) 人乳腺癌细胞（本实验室保存）

SKOV3 (human ovarian carcinoma cell line) 人卵巢癌细胞系（本实验保存）

2.1.2 主要仪器设备

台式离心机（Sigma，美国）1-14 型

台式低温离心机（Techcomp，香港）CT-15RT 型

电热恒温水浴锅（上海一恒科技有限公司，上海）DK-8D 型

分析天平（Mettler Toledo，瑞士）AL104-IC 型

电泳仪（北京六一仪器厂，北京）DYY-7C 型

脱色摇床（北京六一仪器厂，北京）

多功能酶标仪（Thermo scientific，美国）

Disposable 10ml Polypropylene Column (Thermo Scientific, 美国)

0.2μm、0.45μm 滤膜（Sartorius Stedim Biotech, 德国）

净化工作台（上海博迅实业有限公司，上海）

CO₂培养箱（Heal Force, 上海）HF151UV 型

倒置显微镜（OLYMPUS, 日本）

电动移液器（Thermo Scientific, 美国）

多道移液器（Thermo Scientific, 美国）

6孔培养板、10mm 培养皿、96 孔培养板（上海卧宏生物科技有限公司，上海）

流式细胞仪（BD FACS Calibun 公司，美国）EPICS 型

流式细胞仪样品管（由齐念民课题组硕士生刘少娇赠送）

2.1.3 主要试剂

DMEM 培养基（Gibco Life Technology, 美国）

新生牛血清（Biowest, 法国）

青链霉素混合液（北京索莱宝科技有限公司，北京）

牛胰岛素（北京索莱宝科技有限公司，北京）

液体石蜡（国药集团化学试剂有限公司，上海）

Protein G Agarose (Thermo Scientific, 美国)

Binding buffer (Thermo Scientific, 美国)

Elution buffer (Thermo Scientific, 美国)

四甲基乙二胺 TEMED (北京鼎国生物技术有限公司，北京)

PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 美国, 立陶宛制造)

甲醇（上海凌峰化学试剂有限公司，上海）

牛血清白蛋白组分五 BSA (Geneview, 美国)

Goat anti-mouse IgG (联科生物, 上海)

ECL 底物 A 和底物 B (联科生物, 上海)

D-76 型显影粉（天津市世纪奥博贸易有限公司，天津）

酸性显影粉（天津市世纪奥博贸易有限公司，天津）

BugBuster 蛋白提取液（Novagen，德国）

MBP 柱材料（New England Biolabs，英国）

MTT（北京索莱宝科技有限公司，北京）

枸橼酸他莫昔芬（东京化成工业株式会社，日本）

无水乙醇（常熟市杨园化工有限公司，江苏）

二甲基亚砜（Sanland-chem International，厦门）

PI 染色缓冲溶液（由毛振民课题组博士生赵萍赠送）

2.1.4 实验动物

BALB/c 小鼠由上海交通大学药学院动物实验中心提供，本实验室繁殖饲养。

2.2 研究方法

2.2.1 单克隆抗体 18A4 的制备

BALB/c 小鼠腹腔注射液体石蜡（国药集团化学试剂有限公司，上海），用加入 10% 新生牛血清（Biowest，法国）的 DMEM 培养基（High glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium，Gibco Life Technology，美国）扩大培养 18A4 杂交瘤细胞，BALB/c 小鼠腹腔注射 18A4 杂交瘤细胞，生长半个月，观察到小鼠腹腔涨大后，处死，解剖抽取腹水，腹水应呈暗红色。

收集腹水后，立即使用台式低温离心机（Techcomp，香港）在 4 度，4000g 离心 5 分钟，可以观察到腹水分层为三层，上层为脂肪，中层为清澈的淡黄色液体，下层为血红色沉淀，取中层清液即为富含 18A4 单克隆抗体的腹水，每只小鼠约可取 5ml 左右。腹水于-20 度冻存。

2.2.2 单克隆抗体 18A4 的纯化

单克隆抗体 18A4 采用亲和色谱法进行纯化。

将腹水用 0.45μm 的滤膜（Sartorius Stedim Biotech，德国）进行过滤，除去杂质备用。对 Protein G Agarose 材料（Thermo Scientific，美国）进行预处理，除去乙醇后，用 PBS 洗 2 遍，取 1ml 的材料装入商品化的亲和柱（Disposable 10ml Polypropylene Column，Thermo Scientific，美国）。

用亲和柱材料体积 5 倍的 Binding buffer（Thermo Scientific，美国）平衡柱材料。期间将过滤后的腹水与 binding buffer 按体积比 1:1 混合。平衡完成后进行上样，收集流出液。样品完全过柱后，用 5ml Elution buffer（Thermo Scientific，美国）洗脱，每管收集一毫升洗脱液。洗脱后，用 10 体积的 Elution buffer 再生柱材，再用 5 体积的 Binding buffer 洗涤柱材，最后用 1% 叠氮钠在 4 度保存。用考马斯亮蓝 G250 检测 5 管洗脱液中蛋白浓度最高的两管，装入透析袋（北京索莱宝科技有限公司，北京），在 PBS 中 4 度透析过夜，收集到的单克隆抗体 18A4 按照每管 200μL 体积分装后，于-20 度保存。

2.2.3 免疫印迹法测定小鼠腹水对 18A4 抗体富集作用

取间距为 1.5mm 的玻璃板两块，用橡胶条密封后固定在电泳架上，在两块玻璃板间加入水，检查是否密封完全。先配置分离胶，取水 5.25ml，Separating buffer 3.75ml，30% Page Mix 6ml，制备成 12% 的分离胶溶液，取 10% AP 80μL 和 TEMED（北京鼎国生物技术有限公司，北京）20μL，用注射器混匀后立即加入两块玻璃板之间，注入一半体积后加满水，等待分离胶凝固。分离胶凝固后，倒掉水，观察分离胶平整后，开始配置浓缩胶，取水 5ml，30% Page Mix 1ml，Stacking buffer 2ml，取 10% AP 80μL 和 TEMED 20μL，用注射器混匀后立即加入两块玻璃板之间，加满后，插入 15 孔的梳子，等待浓缩胶凝固。

在等待过程中，制备样品，将纯化后的小鼠腹水用 PBS 梯度稀释 16 倍、32 倍、64 倍、128 倍、256 倍、512 倍、1024 倍，18A4 上清用 PBS 稀释 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍，分别加

入五分之一体积的 loading buffer, 在电热恒温水浴锅（一恒科技有限公司，上海）中 95 度水浴加热 5 分钟，即完成样品制备。

除去橡胶条，在电泳槽中加入适量 1×running buffer，依次上样，除分子量 Marker 为 1.5μL 外，其余样品上样量均为 20μL。1 号孔为分子量 Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, 美国, 立陶宛制造)，2-8 号孔分别依次为纯化后的小鼠腹水稀释 16 倍、32 倍、64 倍、128 倍、256 倍、512 倍、1024 倍，9-13 号孔分别依次为 18A4 上清原液和稀释 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍。上样完成后，立即用电泳仪 DYY-7C 型（六一仪器厂，北京）进行电泳，浓缩胶时电压 80V，分离胶时电压 120V。

在电泳期间准备 PVDF (polyvinylidene difluoride, 聚偏氟乙烯) 膜，剪成合适的大小，在正面用签字笔写上日期，用甲醇（上海凌峰化学试剂有限公司，上海）润湿后，用 Blotting Buffer 在脱色摇床（北京六一仪器厂，北京）上置换，直至 PVDF 膜不疏水。

电泳结束后，取下分离胶，将分离胶和 PVDF 膜用夹子固定，两边用已润湿的滤纸贴紧，固定在转移槽上。在 Blotting buffer 中加入 20% 的甲醇（上海凌峰化学试剂有限公司，上海），开始转移蛋白，300mA 转移 40 分钟。

转移时，配置用 TNET 缓冲液配置 5% 的牛奶溶液，转移完成后，将膜充分浸入牛奶中封闭过夜。

第二日取出 PVDF 膜，用 TNET 缓冲液洗去牛奶，用 5% 的 BSA (Geneview, 美国) 溶液按照 1:10000 的比例配置二抗，抗体选用 Goat anti-mouse IgG (联科生物，上海)，在脱色摇床上用二抗室温孵育 1 小时，用 TNET 缓冲液洗 3 遍，每遍 10 分钟。

各取 400μL 的 ECL 底物 A 和底物 B (联科生物，上海) 充分混合后，浸润膜的正面，在 X 光显影暗盒上固定后，尽快在暗室中显影，曝光时间 3-10 分钟，显影时间 3 分钟，定影时间 3 分钟。显影液为 D-76 型显影液 (天津市世纪奥博贸易有限公司，天津)，定影液为酸性显影液 (天津市世纪奥博贸易有限公司，天津)，胶片为柯达公司产品。

2.2.4 单克隆抗体 18A4 的浓度测定

2.2.4.1 考马斯亮蓝 G250 法

考马斯亮蓝 G250 和蒸馏水按照体积比 1:1 混合后使用。配置浓度为 2mg/ml 的 BSA 溶液，梯度稀释为 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍，在 1ml 考马斯亮蓝 G250 中加入 5μL 的各浓度的 BSA 溶液和作为空白对照的蒸馏水，取 200μL 用多功能酶标仪 Micro plate Reader450 (Thermo scientific, 美国) 在 595nm 处测定吸光度，以减去空白对照后的吸光度为纵坐标，BSA 的浓度为横坐标作图，拟合得到标准曲线。

取 5μL 纯化后的单克隆抗体 18A4，加入 1ml 考马斯亮蓝 G250 中，用蒸馏水作为空白对照，各取 200μL 用多功能酶标仪 Micro plate Reader450 (Thermo scientific, 美国) 在 595nm 处测定吸光度，减去空白对照后的吸光度代入拟合曲线的方程中，得到估测的 18A4 的浓度。

2.2.4.2 SDS-PAGE 法

取间距为 1.5mm 的玻璃板两块，用橡胶条密封后固定在电泳架上，在两块玻璃板间加入水，检查是否密封完全。先配置分离胶，取水 5ml, Separating buffer 3.75ml, 30% Page Mix 6.25ml，制备成 13% 的分离胶溶液，取 10% AP 80μL 和 TEMED 20μL，用注射器混匀后立即加入两块玻璃板之间，注入一半体积后加满水，等待分离胶凝固。分离胶凝固后，倒掉水，观察分离胶平整后，开始配置浓缩胶，取水 5ml, 30% Page Mix 1ml, Staking buffer 2ml，取 10% AP 80μL 和 TEMED 20μL，用注射器混匀后立即加入两块玻璃板之间，加满后，插入 15 孔的梳子，等待浓缩胶凝固。

在等待过程中，制备样品，将 2mg/ml 的 BSA 溶液用 PBS 梯度稀释配置成 1.5mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/ml 的浓度，纯化后的两个 18A4 抗体样品用 PBS 稀释 2 倍、4 倍，分别加入五分之一体积的 loading buffer，在电热恒温水浴锅中 95 度水浴加热 5 分钟，即完成样品制备。

除去橡胶条，在电泳槽中加入适量 1×running buffer，依次上样，除分子量 Marker 为 1.5μL 外，其余样品上样量均为 15μL。1 号孔为分子量 Marker，2-9 号孔分别依次为浓度是 2mg/ml、1.5mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/ml 的 BSA 标准溶液，

10-12 号孔分别依次为高浓度的 18A4 抗体原液和稀释 2 倍、4 倍，12-14 号孔分别依次为低浓度的 18A4 抗体原液和稀释 2 倍、4 倍。上样完成后，立即用电泳仪进行电泳，浓缩胶时电压 80V，分离胶时电压 120V。

电泳结束后，立即用考马斯亮蓝 R250 加热染色 5 分钟，染色后先用水洗两遍，而后用脱色液在脱色摇床上过夜脱色。脱色完成后，用扫描仪保存结果。

2.2.5 单克隆抗体 18A4 的表观亲和力的测定

2.2.5.1 抗原 AGR2-MBP 融合蛋白的制备和纯化

取 AGR2-MBP 的重组质粒（实验室制备保存）1-2 μ L，在冰上加入 50-100 μ L 感受态细胞 DH-5 α 中，冰上 30 分钟，42 度热水浴 90 秒，冰上 2-3 分钟，加入 LB 培养基 450 μ L，37℃、150 转/分摇床培养 60 分钟，将菌液涂布在含 100 μ g/ml 的氨苄青霉素的琼脂培养基平板上，37℃倒置培养 12-16 小时。

取出平板，可观察到用白色的单菌落形成，用枪头挑出一个克隆，接种入含有氨苄青霉素的 LB 培养基 100ml 中，37℃、150 转/分摇床培养 12 小时。取 10ml 菌液于含有氨苄青霉素的 LB 培养基 1000ml 中，37℃、150 转/分摇床培养 2 小时左右，控制菌液在 550nm 处的吸光度值为 0.5-1.0 左右。

加入 IPTG 进行大量诱导，使 IPTG 终浓度为 100mmol，37℃、150 转/分摇床培养 4 小时。取 1ml 菌液留样，将其余菌液 4℃，5000g 离心 30 分钟；取 1ml 上清液留样，其余弃去。每瓶加入 10ml PBS 重悬菌液，合并重悬液，用每瓶 10ml PBS 冲洗离心瓶，合并洗液。重悬液与洗液 4℃，5000g 离心 30 分钟。弃取 PBS，得到菌体。称重估算细菌的质量。用细菌质量 1.5-2 倍的 BugBuster 蛋白提取液（Novagen，德国）重悬细菌，在试管翻转器上混合 30 分钟后离心，收集上清液即为细菌裂解液。

将 MBP 柱材料（New England Biolabs，英国）预处理后，填充入亲和柱中，加入 5 体积的 Purification Buffer 平衡，加入细菌裂解液，收集流出液。用 10 体积的 Purification Buffer 洗后，加入 5ml 的 Purification Buffer with Maltose 洗脱液，1ml/管收集编号。用 5 体积的 Purification Buffer with Maltose 再生柱子。加入 0.5% 叠氮钠溶液 4 度保存。

洗脱液中，蛋白浓度高的用透析袋在 PBS 中 4 度透析 12 小时后可以分装在-20 度保存。浓度测定时，按 18A4 抗体的浓度测定中考马斯亮蓝 G250 法操作。

2.2.5.2 非竞争性 ELISA 法

将 AGR2-MBP 蛋白用包被液稀释至终浓度 5 μ g/ml，而后用包被液梯度稀释成 2.5 μ g/ml、1.25 μ g/ml、0.625 μ g/ml 的浓度。每孔加入 100 μ L 包被这四个不同浓度的 AGR2-MBP 蛋白，4 度过夜。

次日将液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟。拍干后加入浓度为 5% 的 BSA 封闭液，每孔 200 μ L，4 度过夜。次日将液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟，拍干后在 4 度保存半年。

将待测样品（18A4 杂交瘤细胞上清和经腹水纯化的 18A4 抗体）经 0.5% BSA 抗体稀释液从 1:10、1:100 到 1:10000000 梯度稀释后，加入四种不同浓度抗原包被的板中，每孔 100 μ L，用 C4 腹水 1: 100 稀释作为阴性对照，用 18A4 杂交瘤细胞上清液作为阳性对照，用抗体稀释液作为空白对照。4 度过夜。

次日将液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟。拍干后加入用 0.5% 的 BSA 溶液按照 1:10000 的比例配置的二抗，每孔 100 μ L，37 度孵育 1 小时。将上述液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟。加入显色液 A、显色液 B 各 80 μ L，于 37 度显色 15 分钟，最后加入 50 μ L 的 2mol 浓硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读数。

数据处理参考 Beatty JD 等建立的非竞争性 ELISA 方法^[73]，用 GraphPad Prism 5 进行计

算和作图。

$$K_a = \frac{n - 1}{2(nA_b' - A_b)} \quad (2-1)$$

根据公式 2-1，n 为包被 AGR2-MBP 蛋白浓度相差的倍数，Ab' 和 Ab 为最大吸光度和最小吸光度的平均值所对应的抗体浓度。这样算出 6 个亲和力常数 K_a ，再将各 K_a 取平均值后即得到样品的亲和力常数。

2.2.5.3 竞争性 ELISA 法

将 AGR2-MBP 蛋白用包被液稀释至终浓度 3 μ g/ml，每孔加入 100 μ L，4 度过夜。次日将液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟。拍干后加入浓度为 5% 的 BSA 封闭液，每孔 200 μ L，4 度过夜。次日将液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟，拍干后可用。

将 AGR2-MBP 蛋白稀释至 1 μ M 的浓度，而后梯度稀释 7-9 个浓度，与 0.1 μ g/ml 的 18A4 抗体按照体积比 1:1 混合后，4 度反应过夜。

将反应后的液体加入已经包被好 AGR2-MBP 的板中，以 0.1 μ g/ml 的 18A4 抗体作为阳性对照，抗体稀释液作为空白对照，每孔 100 μ L，4 度过夜。次日将液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟。拍干后加入用 0.5% 的 BSA 溶液按照 1:10000 的比例配置的二抗，每孔 100 μ L，37 度孵育 1 小时。将上述液体弃去，用 PBS-T 洗 3 遍，每孔 200 μ L，每遍 3 分钟。加入显色液 A、显色液 B 各 80 μ L，于 37 度显色 15 分钟，最后加入 50 μ L 的 2mol 浓硫酸终止反应。用酶标仪在 450nm 处读数。

数据处理用 GraphPad Prism 5，减去空白对照后，计算各样品的吸光值与阳性对照的吸光值的比值，以此比值为纵坐标，抗原浓度的对数作为横坐标作图，即可得到竞争性的表现亲和力曲线，拟合后，得出半数有效浓度，即可估算出亲和力常数。

2.2.6 MTT 法检测单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤细胞 MCF-7 和 SKOV-3 生长的影响

2.2.6.1 实验用他莫昔芬溶液的制备

用分析天平（Mettler Toledo，瑞士）准确称取 0.0567g 枸橼酸他莫昔芬（东京化成工业株式会社，日本），在 15ml 离心管中溶解于 10ml 无水乙醇（常熟市杨园化工有限公司，江苏），加热至 50 度使他莫昔芬完全溶解，待完全溶解后，用 0.2 μ m 的滤膜（Sartorius Stedim Biotech，德国）进行过滤，分装为每毫升一管，即为 10mM 他莫昔芬储存液，于 -20 度保存。

2.2.6.2 MTT 实验

SKOV-3 细胞的培养基为加 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基，MCF-7 细胞的培养基除了含有这些成分外，还需加入终浓度为 0.1 IU/ml 的牛胰岛素（北京索莱宝科技有限公司，北京）。两种培养基均加入 1% 的青链霉素混合液（北京索莱宝科技有限公司，北京）。

MCF-7 细胞和 SKOV-3 细胞用相应的细胞培养液传代培养至对数生长期，经胰酶-EDTA 消化，调整细胞浓度为 5×10^3 - 5×10^4 /ml，用多道移液器（Thermo Scientific，美国）接种于 96 孔板（上海卧宏生物科技有限公司，上海），每孔 200 μ L。查看每孔细胞是否均匀分布。

于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后，弃去板上各孔内原有液体，分别换上待测样品：空白培养基为阴性对照，他莫昔芬（浓度为 1 μ M、3 μ M、5 μ M、7 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M、100 μ M），单克隆抗体 18A4（低 5 μ g/ml、中 10 μ g/ml、15 μ g/ml、高 20 μ g/ml），联用组（1 μ M、3 μ M、5 μ M 的他莫昔芬分别与 5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml 的单克隆抗体 18A4 联用），各种样品设 5 个平行孔。每孔 200 μ L 液体。

48h 后,用多道移液器每孔加入浓度为 5mg/ml 的 MTT 溶液(北京索莱宝科技有限公司,北京) 20 μ l。继续 37 度孵育 4 小时后,弃去 96 孔板上各孔中原有液体,每孔再加入二甲基亚砜 (Sanland-chem International, 厦门) 150 μ l 以溶解沉淀。室温下放置 0.5 h 后,在脱色摇床上振荡 10 分钟,以二甲基亚砜为空白对照,用酶标仪在 490 nm、570nm 波长下测定各孔的吸光值。

用 GraphPad Prism 5 处理数据,每个数据减去空白对照后取平均值,计算标准差,用多样本方差分析考察各组间的差异性。

2.2.7 单克隆抗体 18A4 和他莫昔芬的药物交叉作用实验

为了确定单克隆抗体 18A4 和他莫昔芬联用是否会产生交叉影响,采用等效图线法 (Isobole method) 对联用产生的交叉性影响进行考察,这种方法被广泛运用于评价镇痛药物的相互作用,被认为是对药物联用产生的不良反应的有效评估手段^[74, 75]。

通过 MTT 法完成 18A4 和他莫昔芬单独使用对于 MCF-7 细胞的生长抑制实验,获得抑制 30% 细胞生长时的两种药物的浓度。

通过不同浓度的 18A4 和他莫昔芬联用的正交实验,找出能够使得 MCF-7 细胞生长抑制 30% 的七个不同浓度的 18A4 和他莫昔芬联合用药的组合。记录这些组合的药物浓度。

数据处理时,将这些浓度除以每种药物单用产生 30% 生长抑制的浓度,获得相对浓度比。以他莫昔芬的相对浓度比为横坐标,以 18A4 的相对浓度比为纵坐标,用 GraphPad Prism5 作图,标出七个点的位置,与 $x + y = 1$ 的直线比较,在直线上方的点为拮抗作用(没有交叉影响),在直线下方的为协同作用(有交叉影响)。

2.2.8 流式细胞仪检测单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期的影响

MCF-7 细胞用含有牛胰岛素和 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基连续传代至对数生长期(至少传 2 代),均匀铺至 6 孔板(上海卧宏生物科技有限公司,上海),每孔约 300000 个细胞,在最后一次传代后 24 小时,细胞生长至 80% 满时,换为含有 1% 新生牛血清的 DMEM 培养基,使用“血清剥夺”的方法饥饿 24 小时,使细胞周期同步化。

同步化细胞后,换上含有药物的 DMEM 培养基,设对照组、18A4 组 (20 μ g/ml)、他莫昔芬组 (3 μ M)、联合用药组 (20 μ g/ml 的 18A4 与 3 μ M 的他莫昔芬联用),分别作用细胞 6、12、18、24 小时后收集细胞。

收集细胞时,用胰酶消化细胞,加温热的 DMEM 培养基将细胞轻轻吹散细胞,收集细胞至 15 ml 离心管,在 4 度低温 1000 \times g 离心 5 min 收集细胞。弃上清,用 10 ml PBS 洗细胞两遍,除去血清的影响。

加入约 1 毫升的冰上预冷的 PBS,重悬,加入 9ml 预冷的 75% 乙醇中固定,混匀,在冰上孵育 4 小时或 4 度过夜。

4 度低温 1000 \times g 离心 5 min 收集细胞,弃上清,加 15 ml 1 \times PBS 在冰上重悬细胞。4 度低温 1000 \times g 离心 5 min 收集细胞,弃上清。

加 400 μ L 终浓度 50 μ g/ml PI 染色缓冲溶液(由毛振民课题组博士生赵萍赠送),缓慢并充分重悬细胞沉淀,37 度避光常温染色 30 分钟。随后可以 4 度或冰浴、避光存放。染色完成在当日完成流式细胞仪的检测。

上样前要将细胞用移液器吹打均匀后,加入流式细胞仪专用的样品管(由齐念民课题组硕士生刘少娇赠送)。

数据处理使用 Modfit for Mac V3.0 进行分析,设置门时分析全部细胞,自动得出全部细胞 G0-G1 期、S 期、G2-M 期的比例,对比观察各组的 G0-G1 期的变化。

2.3 本章小结

本章主要介绍了研究所涉及的细胞株、主要仪器设备、主要试剂、实验动物和详细的研究方法。

在研究单克隆抗体 18A4 的制备方法和性质表征上，介绍了单克隆抗体 18A4 的制备、纯化方法，通过 Western Blot 的方法证明从小鼠腹水中纯化高浓度抗体的优势，而后建立了一些指标用以控制单克隆抗体 18A4 的质量标准，有浓度、表观亲和力等，测定 18A4 的浓度使用了考马斯亮蓝 G250 法和 SDS-PAGE 法，测定 18A4 的表观亲和力采用了非竞争性 ELISA 法和竞争性 ELISA 法。

在研究单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤细胞的作用上，介绍了用 MTT 法测定联合用药对乳腺癌细胞 MCF-7 和卵巢癌细胞 SKOV-3 生长的影响的方法，并用等效图线法分析两种药物的交叉反应。

在研究单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用抑制肿瘤生长的可能机制上，介绍了使用流式细胞技术检测了联合用药对 MCF-7 细胞周期的影响的方法。

第三章 结果与分析

3.1 单克隆抗体 18A4 的浓度和表观亲和力

3.1.1 纯化后单克隆抗体 18A4 的浓度

3.1.1.1 考马斯亮蓝 G250 法

通过对标准浓度的 BSA 进行的梯度稀释，获得了 595nm 波长下的考马斯亮蓝 G250 相对于空白对照的吸光度与蛋白浓度关系的标准曲线，如图 3-1 所示。

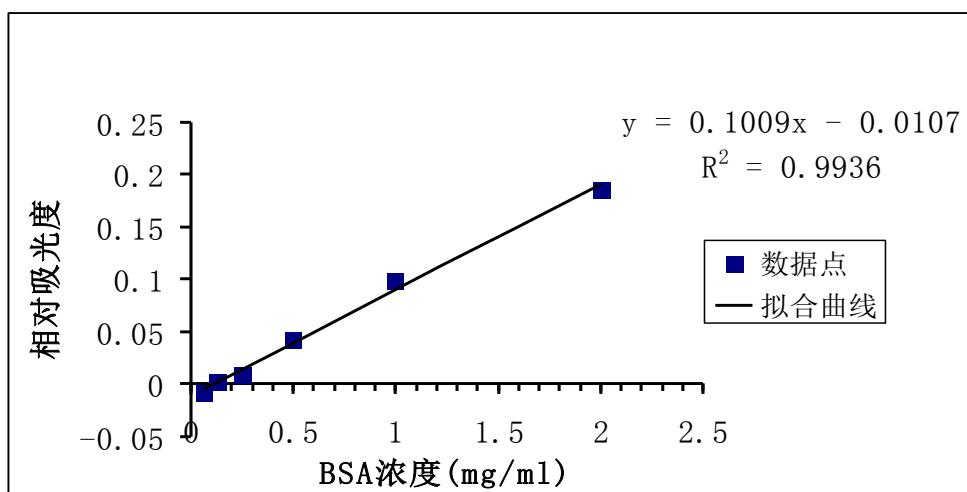


图 3-1 考马斯亮蓝 G250 的相对吸光度与蛋白浓度的关系的标准曲线

通过以上数据点进行拟合，得到了线性范围内考马斯亮蓝 G250 的相对吸光度与蛋白浓度关系的标准曲线的计算公式，如公式 3-1 所示，其中 y 代表相对于空白对照的吸光度，x 代表蛋白的浓度。

$$y = 0.1009x - 0.0107 \quad (3-1)$$

公式 3-1 的方差为 0.9936，显示梯度稀释的精密度较好，此公式可以进行实际样品的蛋白浓度的计算。

用同一瓶考马斯亮蓝 G250 按相同方法测得两份纯化后的单克隆抗体 18A4（编号分别为 E2 和 E3）的吸光度，减去空白对照后，将相对吸光度代入公式 3-1 计算得到这两份单克隆抗体 18A4 的浓度，两份样品的相对吸光度和抗体浓度数据如表 3-1 所示。

表 3-1 两份纯化后的单克隆抗体 18A4 的浓度

样品	单克隆抗体 18A4 E2	单克隆抗体 18A4 E3
相对吸光度	0.146	0.046
抗体浓度 (mg/ml)	1.56	0.36

分析以上结果,考马斯亮蓝 G250 法测得两份单克隆抗体 18A4 的浓度分别为 1.56mg/ml 和 0.36mg/ml, 纯化后的单克隆抗体 18A4 具有较高的浓度, 能够满足体内外实验的需要。

3. 1. 1. 2 SDS-PAGE 法

通过 SDS-PAGE 法分离了不同浓度的 BSA 和两份单克隆抗体 18A4 样品 (编号分别为 E2 和 E3), 进行考马斯亮蓝 R250 染色后的结果如图 3-2 所示。

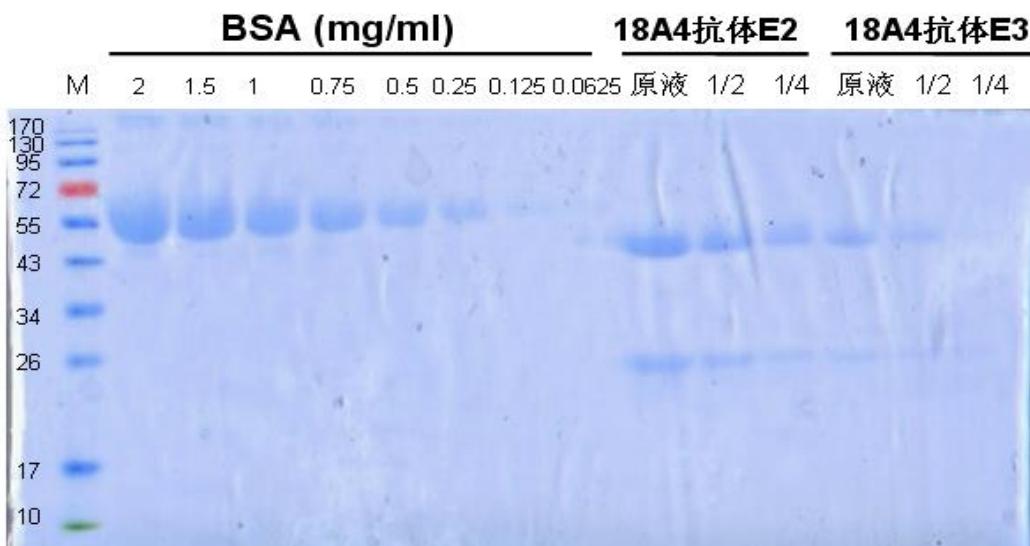


图 3-2 用 SDS-PAGE 法估测单克隆抗体 18A4 的浓度

BSA 的分子量约为 66KDa, 18A4 单克隆抗体重链的分子量约为 50KDa, 轻链的分子量约为 25KDa, 图 3-2 中各条带的位置符合预期。

单克隆抗体 18A4 的条带仅有重链和轻链, 没有杂带, 显示了 Protein G 纯化除去了腹水中的较多杂质, 获得了纯度较高的单克隆抗体。

目测样品 E2 的重链条带与 1mg/ml BSA 条带的浓度相似, 由于重链占抗体蛋白总量的三分之二, 可以估测单克隆抗体 18A4 样品 E2 的浓度约为 1.5mg/ml, 接近考马斯亮蓝 G250 法测得的浓度。

目测样品 E3 的重链条带浓度在 0.125mg/ml 和 0.25mg/ml BSA 条带的浓度之间, 可以估测单克隆抗体 18A4 样品 E3 的浓度范围为 0.25-0.45mg/ml, 考马斯亮蓝 G250 法测得的 E3 浓度在此范围之内。

分析以上结果, SDS-PAGE 法能够显示单克隆抗体 18A4 的重链、轻链分子量大小符合预期, 同时显示出纯化后的单克隆抗体 18A4 的纯度较好, 估测 18A4 抗体的浓度与考马斯亮蓝 G250 法相近。

本方法在确定浓度的同时, 可以确认抗体的纯度, 是考马斯亮蓝 G250 法的一种补充。

3. 1. 2 用小鼠腹水进行亲和纯化能获得更高浓度的抗体

为了比较从小鼠腹水中纯化与直接从杂交瘤细胞培养液中纯化单克隆抗体 18A4 在获得抗体浓度上的不同, 使用从上述两种途径获得的单克隆抗体 18A4 经适当比例稀释后, 进行了 Western Blot 检测, 结果如图 3-3 所示。

分析图 3-3 中的条带位置, 18A4 的重链分子量在 50KDa 附近, 轻链分子量在 25kDa 附近, 条带的位置符合预期。同时, 使用 Goat anti-mouse IgG 作为二抗, 能检测到 18A4 的重链和轻链的条带, 说明 18A4 是一个鼠源的抗体。

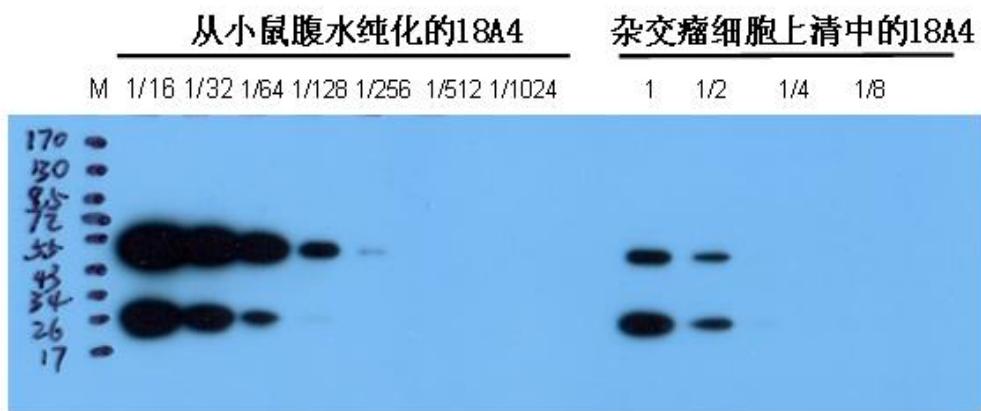


图 3-3 从小鼠腹水中纯化 18A4 能获得更高浓度的抗体

分析图 3-3 中的条带浓度，目测杂交瘤细胞上清原液中的 18A4 重链条带与从小鼠腹水中纯化的 18A4 稀释 128 倍的重链条带的浓度相当。从小鼠腹水中纯化的 18A4 稀释 256 倍后仍能看到重链的条带，但杂交瘤细胞上清的 18A4 稀释 4 倍后检测不到重链的条带。

以上结果均说明从小鼠腹水中纯化确实能够获得更高途径的单克隆抗体。

3.1.3 单克隆抗体 18A4 的表观亲和力

3.1.3.1 与同浓度的抗原结合的能力——非竞争性 ELISA 法

非竞争性 ELISA 法显示了不同浓度的抗体与相同浓度的抗原结合的能力。

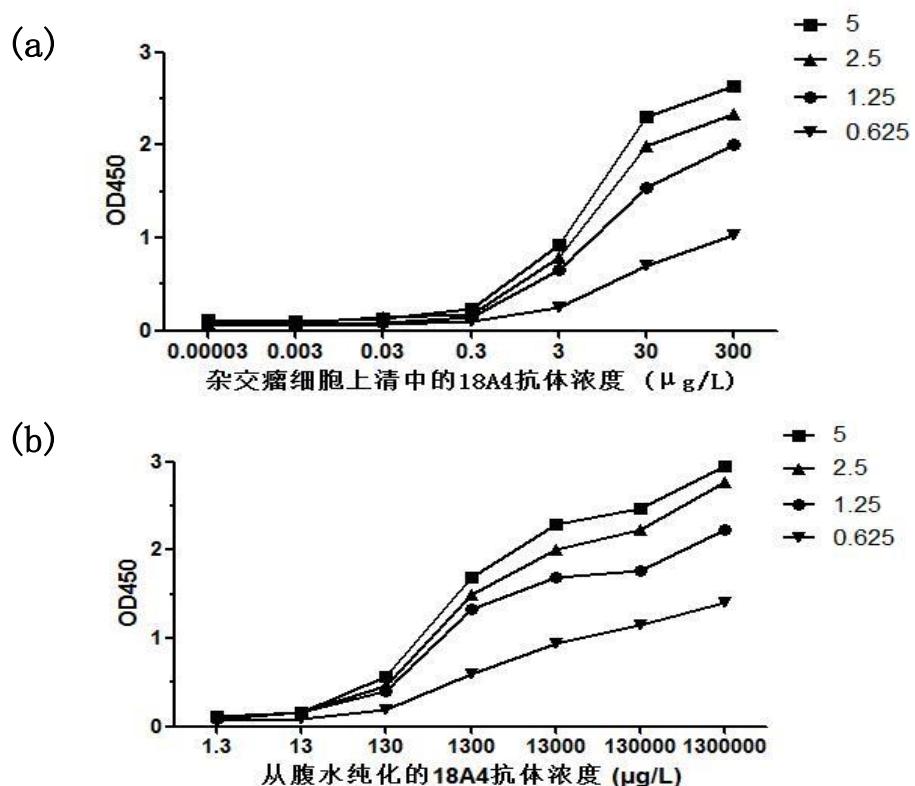


图 3-4 非竞争性 ELISA 法测定单克隆抗体 18A4 的表观亲和力

(a) 杂交瘤细胞上清中 18A4 的表观亲和力, (b) 从小鼠腹水中纯化的 18A4 的表观亲和力

图 3-4 (a) 所示的是杂交瘤细胞上清中的 18A4 的非竞争性 ELISA 结果, 图 3-4 (b) 所示的是从小鼠腹水中纯化的 18A4 的非竞争性 ELISA 结果, 对这两者的表观亲和力进行比较, 可以看出 Protein G 亲和纯化对于单克隆抗体表观亲和力的影响。

图 3-4 (a) 所示的是杂交瘤细胞上清中的 18A4 的非竞争性 ELISA 结果, 图 3-4 (b) 所示的是从小鼠腹水中纯化的 18A4 的非竞争性 ELISA 结果, 对这两者的表观亲和力进行比较, 可以看出 Protein G 亲和纯化对于单克隆抗体表观亲和力的影响。

从图 3-4 (a) 中的结果分析, 结合公式 2-1 进行计算, 杂交瘤细胞上清中的 18A4 的表观亲和力为 $8.76 \times 10^9 \text{ L/mol}$ 。从图 3-4 (b) 中的结果分析, 结合公式 2-1 进行计算, 从小鼠腹水中纯化的 18A4 的表观亲和力为 $8.38 \times 10^7 \text{ L/mol}$ 。

分析这两种不同来源的 18A4 抗体的表观亲和力的变化, 说明从小鼠腹水中进行 Protein G 的亲和纯化对于单克隆抗体 18A4 的表观亲和力是有影响的, 从腹水中亲和纯化使抗体的表观亲和力下降了约 100 倍, 但还是在一般抗体 $10^6\text{-}10^9 \text{ L/mol}$ 的亲和力范围内。

由于抗原表位的关系, 抗体与抗原的亲和力与抗体的生物学活性并不成正比, 从腹水纯化 18A4 的方法的对抗体的抗肿瘤活性是否有影响还需进一步实验研究。

非竞争性 ELISA 法仅显示了不同浓度的单克隆抗体与已经固定好的同浓度的抗原的结合能力, 对于在液体环境中同浓度的单克隆抗体与不同浓度的抗原的结合能力, 还需要通过竞争性 ELISA 法来表征。

3.1.3.2 与不同浓度抗原的结合能力——竞争性 ELISA 法

竞争性 ELISA 是显示相同浓度的抗体在液体环境中与不同浓度的抗原结合的能力。

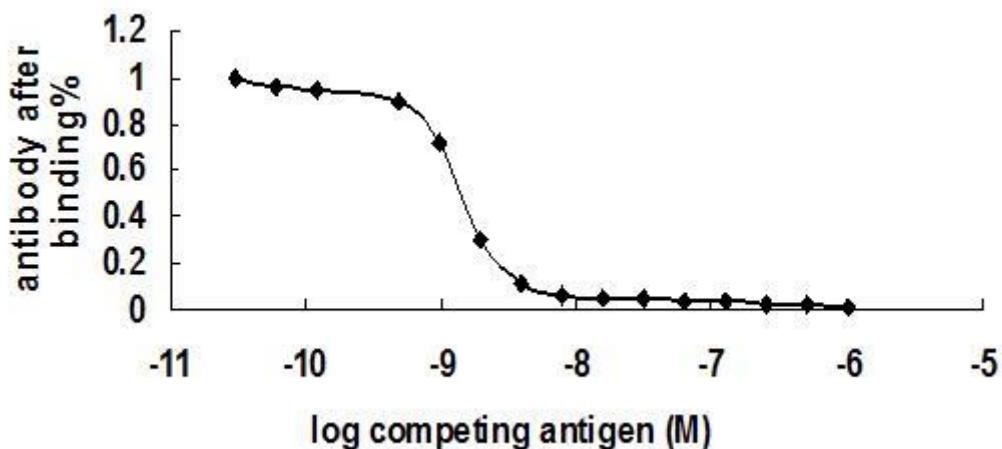


图 3-5 竞争性 ELISA 法测定单克隆抗体 18A4 的表观亲和力

分析图3-5的结果, 可以得到在液体环境下, 单克隆抗体18A4能够与不同浓度的 AGR2-MBP 抗原结合, 达到半数结合时的抗原浓度约为 10^{-9} Mol 。

根据单克隆抗体18A4的SDS-PAGE结果, 其重链分子量为50KDa, 轻链分子量为25KDa, 单克隆抗体由两条重链和两条轻链通过二硫键连接而成, 18A4的总分子量为150KDa。可以换算出达到半数结合时抗原的浓度为 $1.5 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$ 。

经计算, 竞争性 ELISA 法测得的单克隆抗体18A4的表观亲和力为 $1.017 \times 10^6 \text{ L/mol}$ 。

3.2 单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用抑制肿瘤细胞的生长

3.2.1 乳腺癌细胞 MCF-7 对 18A4 和他莫昔芬均敏感

通过 MTT 法研究 18A4 和他莫昔芬单用对于乳腺癌细胞 MCF-7 生长的影响，实验结果如图 3-6 所示，其中图 3-6 (a) 为不同浓度的他莫昔芬对 MCF-7 细胞生长的影响，图 3-6 (b) 为不同浓度的 18A4 对 MCF-7 细胞生长的影响。

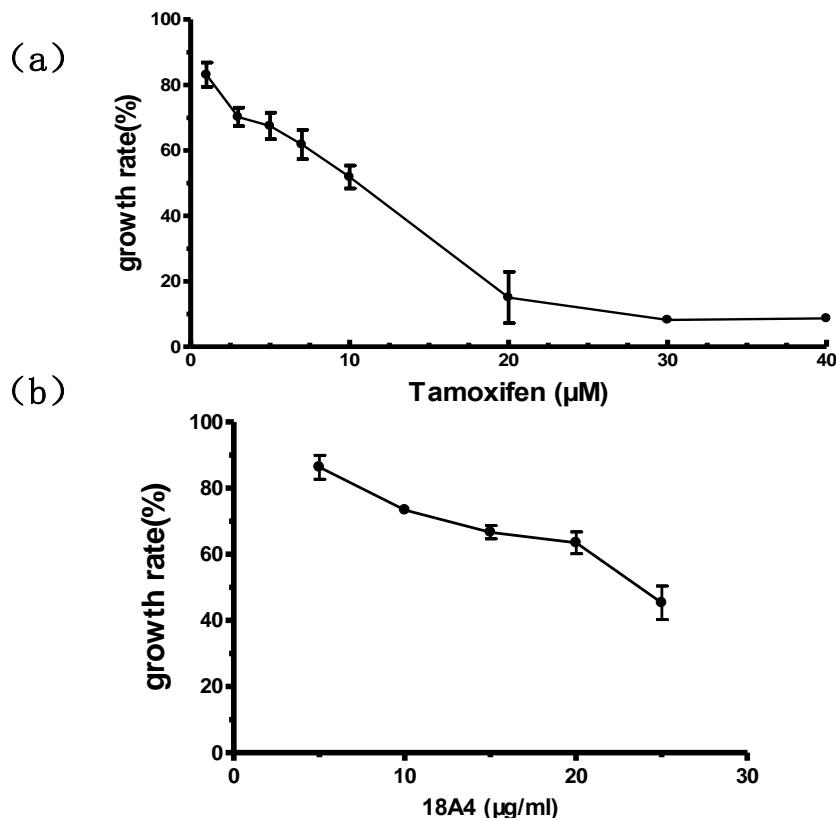


图 3-6 他莫昔芬和 18A4 单用 48 小时对乳腺癌细胞 MCF-7 生长的影响

(a) 不同浓度他莫昔芬对 MCF-7 生长的影响；(b) 不同浓度 18A4 对 MCF-7 生长的影响

分析图 3-6 (a) 中 MCF-7 细胞的生长百分率，他莫昔芬作用 48 小时后，当他莫昔芬浓度为 $3\mu\text{M}$ 时，MCF-7 的生长百分率为对照的 70.2%，达到了 IC_{30} ；他莫昔芬浓度为 $10\mu\text{M}$ 时，MCF-7 的生长百分率为对照的 51.7%，这个浓度已经在半数杀伤浓度 IC_{50} 附近；他莫昔芬浓度为 $20\mu\text{M}$ 时，MCF-7 的生长百分率为对照的 15.04%，更高浓度的他莫昔芬对 MCF-7 细胞的生长有更强的抑制。这些结果显示出他莫昔芬对乳腺癌 MCF-7 细胞具有较强的抑制作用，这与 MCF-7 细胞是雌激素受体阳性，并对他莫昔芬敏感的性质是相吻合的。

分析图 3-6(b) 中 MCF-7 细胞的生长百分率，单克隆抗体 18A4 作用 48 小时后，当 18A4 的浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 时，MCF-7 的生长百分率为对照的 73.3%，接近 IC_{30} ；当 18A4 的浓度为 $25\mu\text{g/ml}$ 时，MCF-7 的生长百分率为对照的 45.3%，接近 IC_{50} ，本实验未涉及更高浓度的 18A4 对 MCF-7 的生长的影响。这些结果显示 18A4 对乳腺癌细胞 MCF-7 具有一定的杀伤作用，这与 MCF-7 细胞中有较多 AGR2 表达，并对 18A4 是敏感的性质是吻合的。

综上所述，乳腺癌细胞 MCF-7 对单克隆抗体 18A4 和他莫昔芬均敏感。

3.2.2 18A4 与他莫昔芬联用在他莫昔芬低浓度时增强对 MCF-7 生长抑制

图 3-6 所示的结果提示了进一步研究 18A4 与他莫昔芬联用的合适浓度。因为他莫昔芬在浓度为 $10\mu\text{M}$ 时达到 IC_{50} , 18A4 在浓度为 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 时达到 IC_{50} , 指示研究这两种药物联用时的浓度应在这两个浓度以下, 否则联用的药效将被其中一种药物的药效所掩盖, 而且易产生毒副作用。

根据 18A4 和他莫昔芬单用对 MCF-7 细胞生长影响的实验数据, 确定了他莫昔芬和 18A4 在联用时的合适浓度范围, 在范围内选择几个浓度进行两种药物联用的实验, 与单用两种药物对 MCF-7 细胞生长的作用进行比较, 结果如图 3-7 所示。

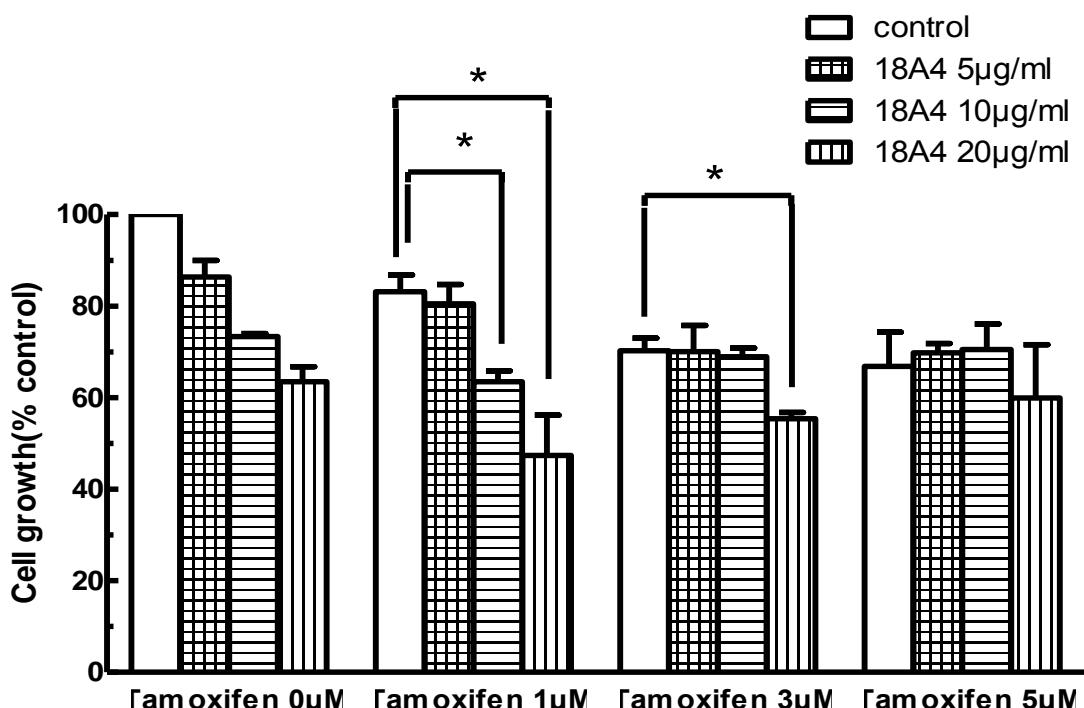


图 3-7 单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对 MCF-7 细胞生长的影响

平行实验数 $n=5$, 显著性差异 (*) 为 $P < 0.05$

他莫昔芬浓度为 $1\mu\text{M}$ 时, 对照组即单用他莫昔芬时 MCF-7 细胞生长百分率为 83.1%。联用组中, 他莫昔芬与 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时, MCF-7 细胞的生长百分率为 63.4%; 与 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时, MCF-7 细胞的生长百分率为 47.3%, 以上两个联用组与对照组的生长百分率均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

他莫昔芬浓度为 $3\mu\text{M}$ 时, 对照组即单用他莫昔芬时 MCF-7 细胞生长百分率为 70.2%。联用组中, 仅有他莫昔芬与 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时, MCF-7 细胞生长率为 55.3%, 与对照组的生长百分率有显著性差异 ($P < 0.05$)。

他莫昔芬浓度为 $5\mu\text{M}$ 时, 对照组即单用他莫昔芬时 MCF-7 细胞生长百分率为 66.8%。联用组中, 他莫昔芬分别与 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时, MCF-7 的生长百分率分别为 69.8%、70.5% 和 59.9%, 与对照组均没有显著性差异 ($P \geq 0.05$)。

综合分析图 3-7 中的多种联用组合中, 仅有 $1\mu\text{M}$ 的他莫昔芬与 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用以及 $3\mu\text{M}$ 的他莫昔芬与 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用的三个组合与对照有显著性差异。在 18A4 的较低浓度, 如 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 抗体本身的药效不足; 在他莫昔芬的较高浓度, 如 $5\mu\text{M}$ 时, 他

莫昔芬的药效过强，掩盖了联用产生的效果。这两种情况下联合用药增强对肿瘤细胞 MCF-7 生长抑制的作用均不显著。

因此，联合用药增强对肿瘤细胞 MCF-7 的生长抑制作主要与他莫昔芬的浓度有关，他莫昔芬与单克隆抗体 18A4 联用能够在他莫昔芬低浓度时增强对 MCF-7 细胞生长的抑制作用。

3.2.3 18A4 和他莫昔芬对 MCF-7 的生长抑制作用没有交叉影响

为了研究联合用药可能存在的副作用，采用等效图线法研究 18A4 与他莫昔芬联用对 MCF-7 生长的抑制作用是否有交叉影响。

通过图 3-6 的结果，他莫昔芬杀伤 30% 细胞的浓度为 $3\mu\text{M}$ ，单克隆抗体 18A4 杀伤 30% 细胞的浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ，以这两个浓度为标准，增加或减少两种药物的使用量进行正交实验，得到杀伤 30% 细胞的等效图线，如图 3-8 所示。

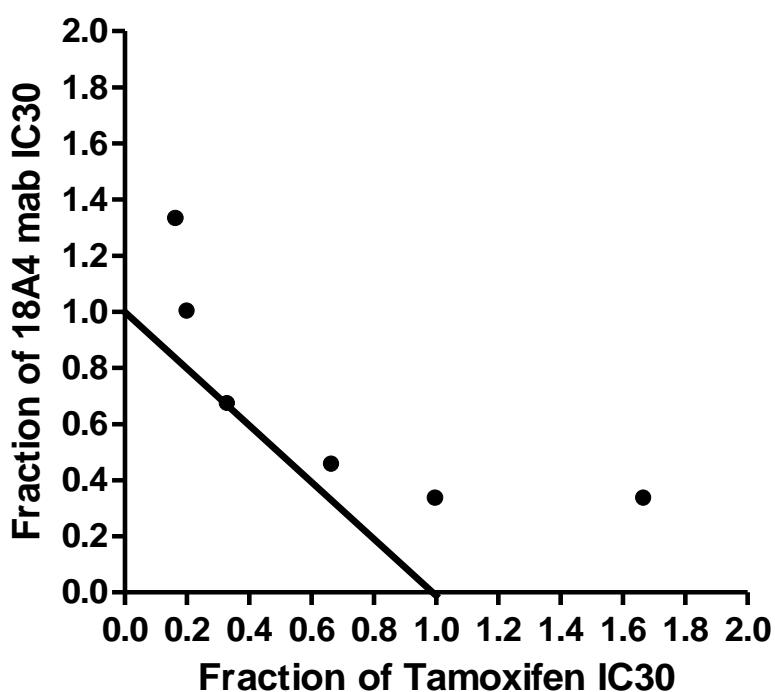


图 3-8 等效图线法显示他莫昔芬与 18A4 对 MCF-7 的生长抑制作用没有交叉影响
(图中的直线为 $x + y = 1$)

分析图 3-8 中的结果，除了有一个组合是在 $x + y = 1$ 的直线上以外，其余的组合均在这一条直线的上方，结合等效图线法的原理，即在直线上方的点为拮抗作用（没有交叉影响），在直线下方的为协同作用（有交叉影响），可以做出判断。

他莫昔芬与 18A4 对 MCF-7 细胞的生长抑制作用没有交叉影响。这结果与他莫昔芬与 18A4 在药物机制上不同的事实相符合。

3.2.4 卵巢癌细胞 SKOV-3 对 18A4 和他莫昔芬均不敏感

通过 MTT 法研究 18A4 和他莫昔芬单用对于卵巢癌细胞 SKOV-3 生长的影响，实验结果如图 3-9 所示，其中图 3-9 (a) 为不同浓度的他莫昔芬对 SKOV-3 细胞生长的影响，图 3-9 (b) 为不同浓度的 18A4 对 SKOV-3 细胞生长的影响。

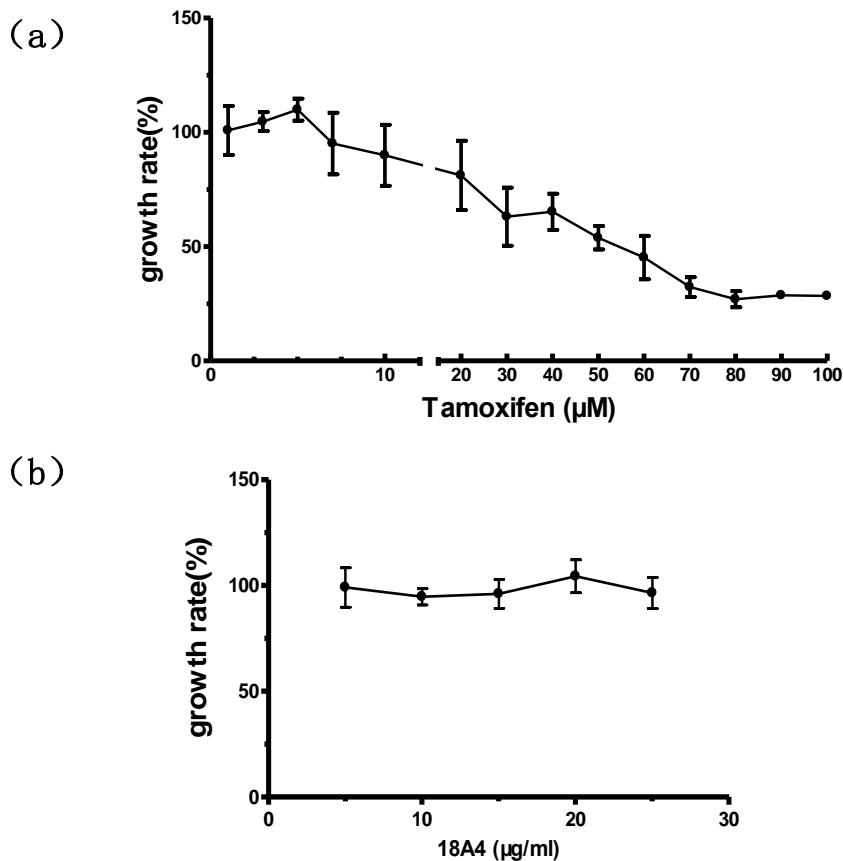


图 3-9 他莫昔芬和 18A4 单用 48 小时对卵巢癌细胞 SKOV-3 生长的影响

(a) 不同浓度他莫昔芬对 SKOV-3 生长影响; (b) 不同浓度 18A4 对 SKOV-3 生长影响

分析图 3-9 (a) 中 SKOV-3 细胞的生长百分率, 他莫昔芬作用 48 小时后, 当他莫昔芬浓度分别为 $1\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 时, SKOV-3 的生长百分率分别为对照的 100.8%、104.6%、109.9%, 均指示这三个他莫昔芬浓度对于 SKOV-3 细胞几乎无效; 他莫昔芬浓度为 $10\mu\text{M}$ 时, SKOV-3 的生长百分率为对照的 89.9%, 显示他莫昔芬开始产生药效; 他莫昔芬浓度为 $50\mu\text{M}$ 时, SKOV-3 的生长百分率为对照的 53.88%, 接近 IC_{50} ; 更高浓度的他莫昔芬对 SKOV-3 细胞的生长有更强的抑制。这些结果显示出他莫昔芬能够抑制卵巢癌细胞 SKOV-3 的生长, 但是不如对 MCF-7 细胞生长抑制强。这些结果与 SKOV-3 细胞是雌激素受体阳性, 但对他莫昔芬有耐药性^[76]的性质是相吻合的。

分析图 3-9 (b) 中 SKOV-3 细胞的生长百分率, 单克隆抗体 18A4 作用 48 小时后, 当 18A4 的浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 时, SKOV-3 的生长百分率为对照的 99.1%; 当 18A4 的浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 时, SKOV-3 的生长百分率为对照的 94.6%; 当 18A4 的浓度为 $15\mu\text{g/ml}$ 时, SKOV-3 的生长百分率为对照的 96.1%; 当 18A4 的浓度为 $20\mu\text{g/ml}$ 时, SKOV-3 的生长百分率为对照的 104.3%; 当 18A4 的浓度为 $25\mu\text{g/ml}$ 时, SKOV-3 的生长百分率为对照的 94.4%。这些结果显示 18A4 对卵巢癌 SKOV-3 的生长抑制效果微弱, 这与 SKOV-3 细胞不表达 AGR2 性质是吻合的。

综上所述, 卵巢癌细胞 SKOV-3 对单克隆抗体 18A4 和他莫昔芬均不敏感。

3.2.5 18A4 与他莫昔芬联用在他莫昔芬高浓度时增强对 SKOV-3 生长抑制

根据 18A4 和他莫昔芬单用对 SKOV-3 细胞生长影响的实验数据，确定了在对 SKOV-3 细胞无效的他莫昔芬浓度，即 $1\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 时进行两种药物联用的实验，更能体现联用对肿瘤细胞生长影响的意义。联合用药与分别单用两种药物对 SKOV-3 细胞生长的作用进行比较，结果如图 3-10 所示。

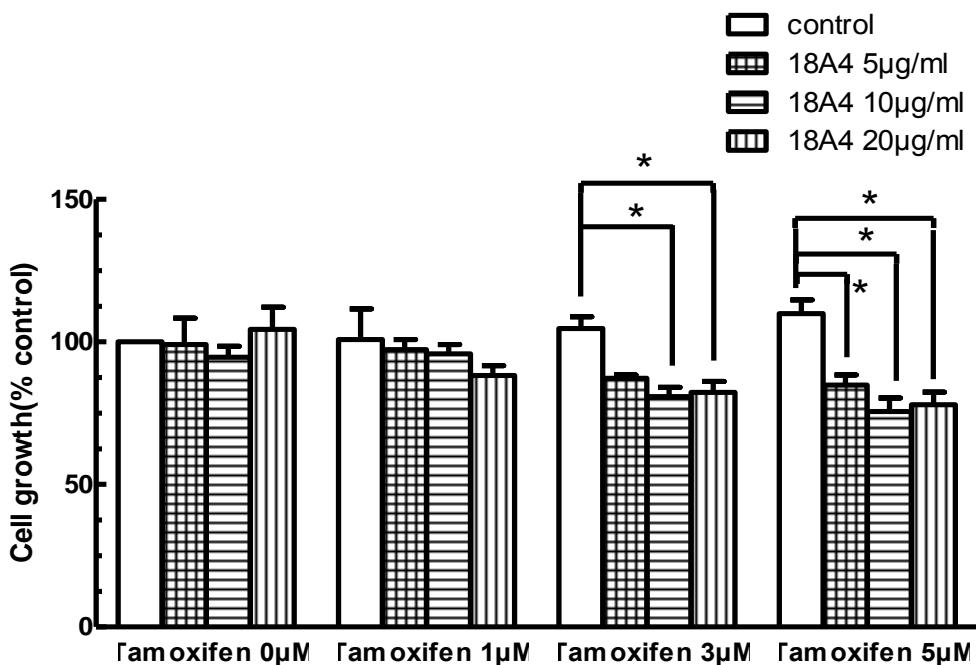


图 3-10 单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对 SKOV-3 细胞生长的影响

平行实验数 $n=5$ ，显著性差异 (*) 为 $P < 0.05$

他莫昔芬浓度为 $1\mu\text{M}$ 时，对照组即单用他莫昔芬时 SKOV-3 细胞生长百分率为 100.8%。联用组中，他莫昔芬分别与 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时，SKOV-3 细胞的生长百分率分别为 97.3%、95.7%、88.2%，以上三个联用组与对照组的生长百分率相比均没有显著性差异 ($P \geq 0.05$)。

他莫昔芬浓度为 $3\mu\text{M}$ 时，对照组即单用他莫昔芬时 SKOV-3 细胞生长百分率为 104.6%。联用组中，他莫昔芬与 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时，SKOV-3 细胞生长率为 80.7%；与 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时，SKOV-3 细胞生长率为 82.3%，以上两个联用组与对照组的生长百分率有显著性差异 ($P < 0.05$)。

他莫昔芬浓度为 $5\mu\text{M}$ 时，对照组即单用他莫昔芬时 SKOV-3 细胞生长百分率为 109.9%。联用组中，他莫昔芬分别与 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用时，SKOV-3 的生长百分率分别为 84.8%、75.5% 和 77.9%，与对照组均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

综合分析图 3-10 中的多个联用组合中，有 $3\mu\text{M}$ 的他莫昔芬与 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用以及 $5\mu\text{M}$ 的他莫昔芬与 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 18A4 联用的五个组合与对照组存在显著性差异。

在他莫昔芬浓度较低时，如 $1\mu\text{M}$ 时，联合用药增强对 SKOV-3 细胞生长的抑制作用就不显著，提示了联合用药增强对 SKOV-3 的生长抑制也与他莫昔芬的浓度有关，他莫昔芬与单克隆抗体 18A4 联用能够在他莫昔芬高浓度时增强对 SKOV-3 细胞生长的抑制作用。

3.3 单克隆抗体 18A4 增强他莫昔芬对 MCF-7 细胞周期阻滞作用

根据图 3-7 的实验结果,选择 18A4 和他莫昔芬联用对 MCF-7 细胞生长抑制增加最先祖的浓度进行进一步研究,即 18A4 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 他莫昔芬浓度为 3 μM 。

共测定了联合用药在三个时间点对于 MCF-7 细胞周期的调控,即作用 12 小时、18 小时和 24 小时。

作用 12 小时的流式细胞仪检测结果如图 3-11 所示。

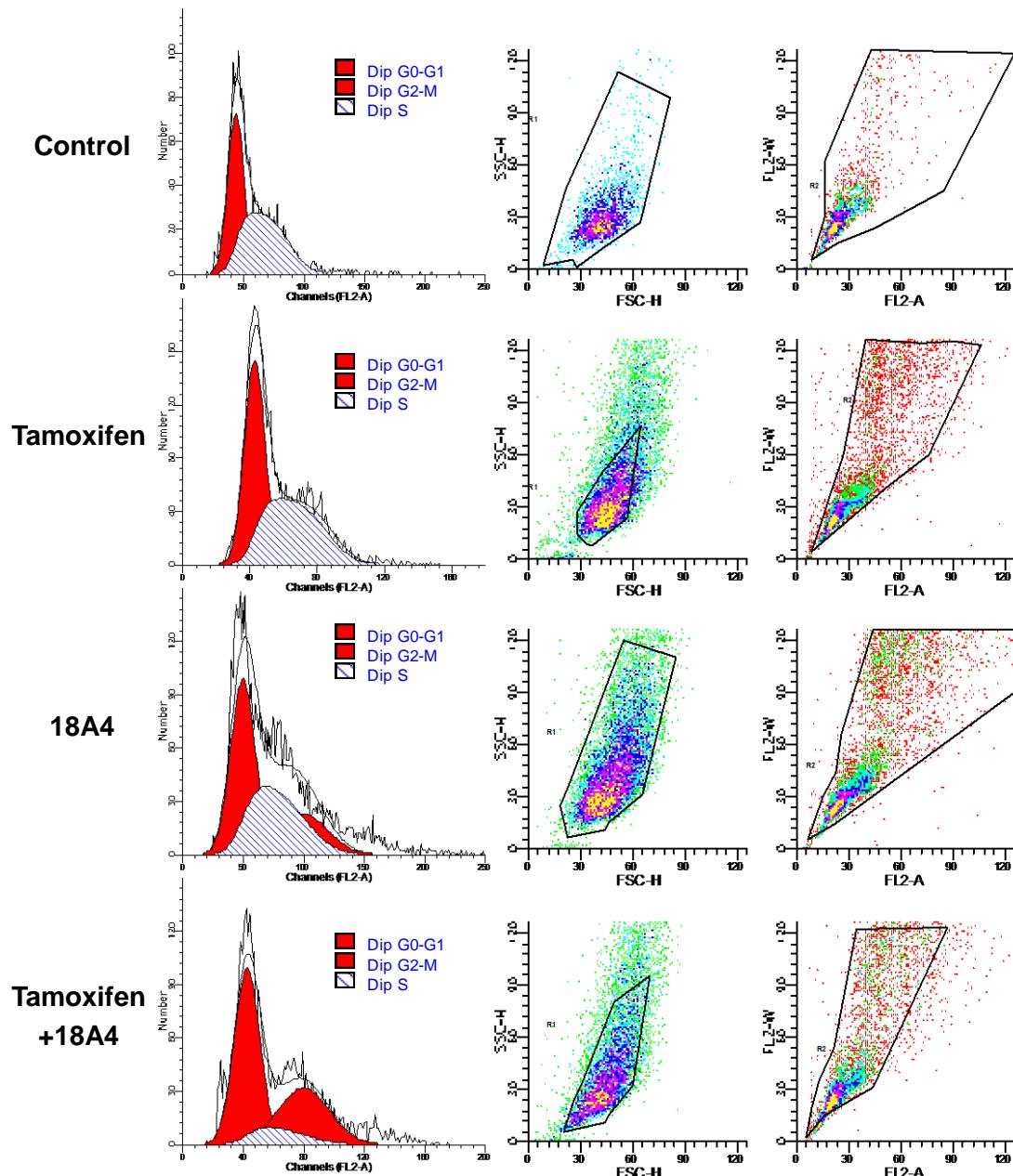


图 3-11 作用 12 小时流式细胞仪的检测结果
(18A4 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 他莫昔芬浓度为 3 μM)

作用 12 小时, MCF-7 细胞周期分布如图 3-12 所示。

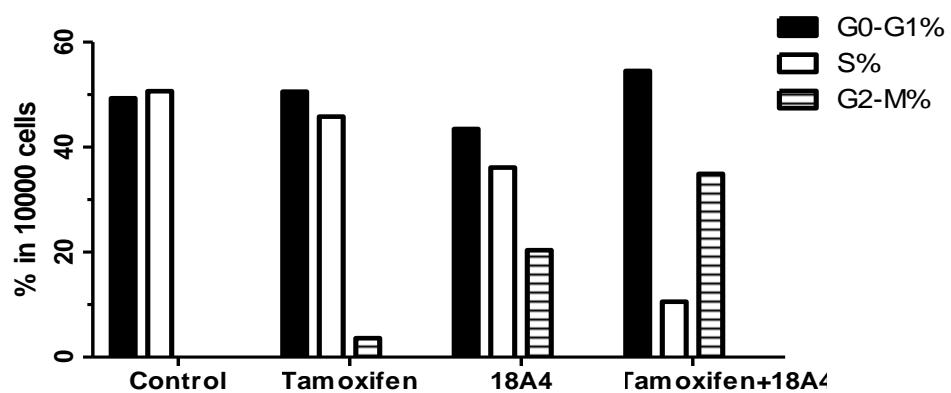


图 3-12 作用 12 小时 MCF-7 细胞的周期分布

作用 18 小时的流式细胞仪检测结果如图 3-13 所示。

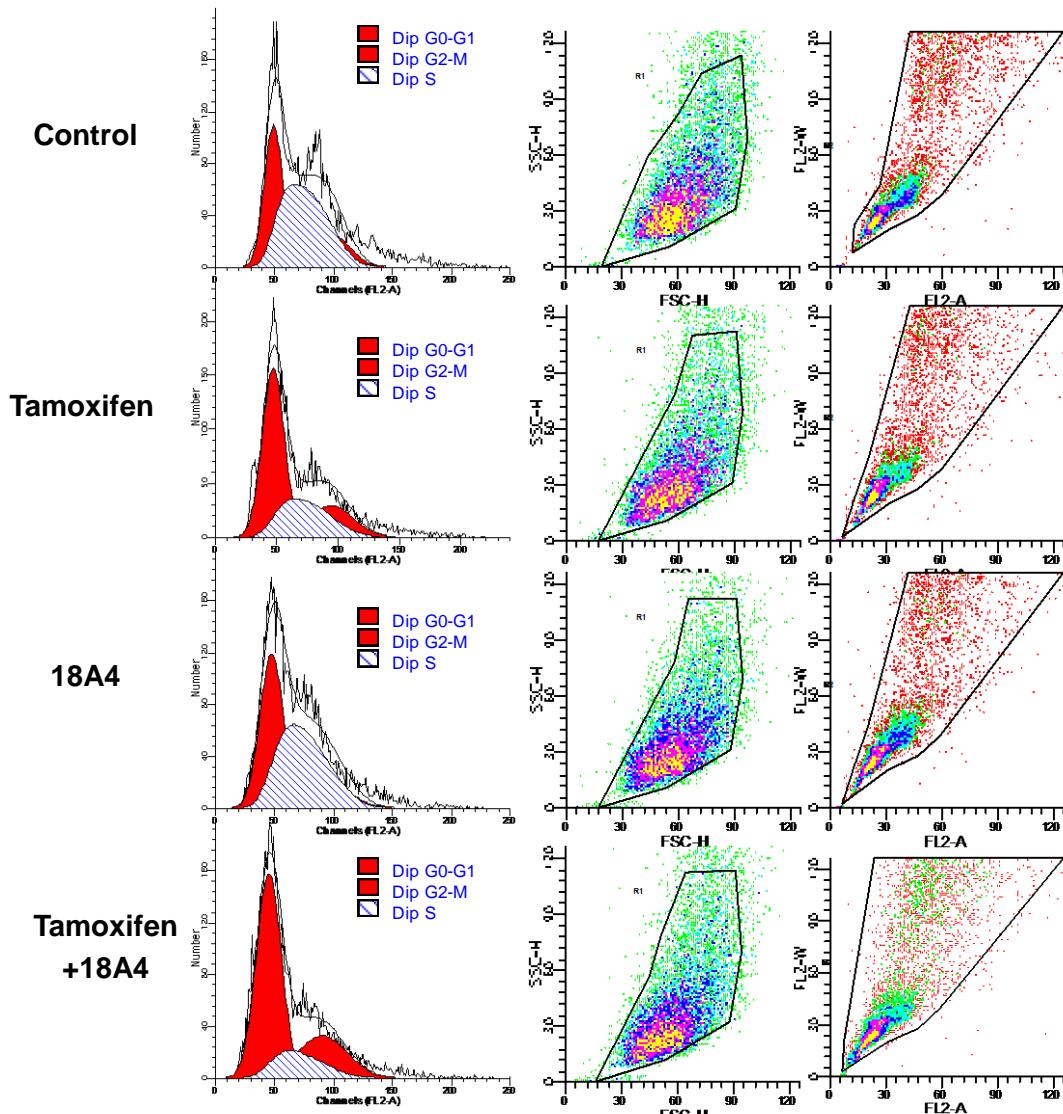


图 3-13 作用 18 小时流式细胞仪的检测结果

(18A4 浓度为 20 μ g/ml, 他莫昔芬浓度为 3 μ M)

作用 18 小时, MCF-7 细胞周期分布如图 3-14 所示。

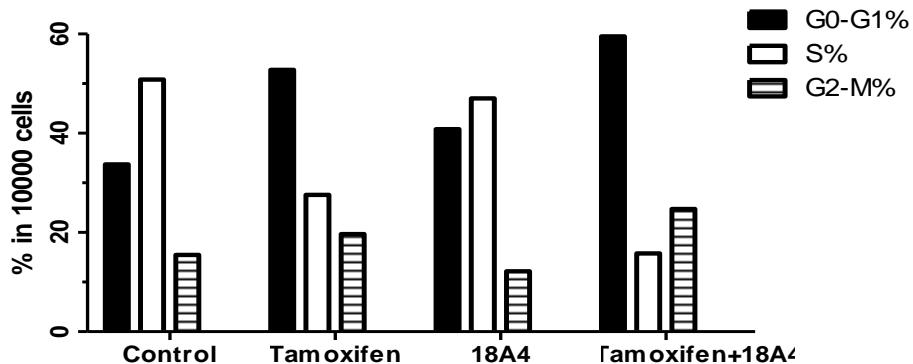


图 3-14 作用 18 小时 MCF-7 细胞的周期分布

作用 24 小时的流式细胞仪检测结果如图 3-15 所示。

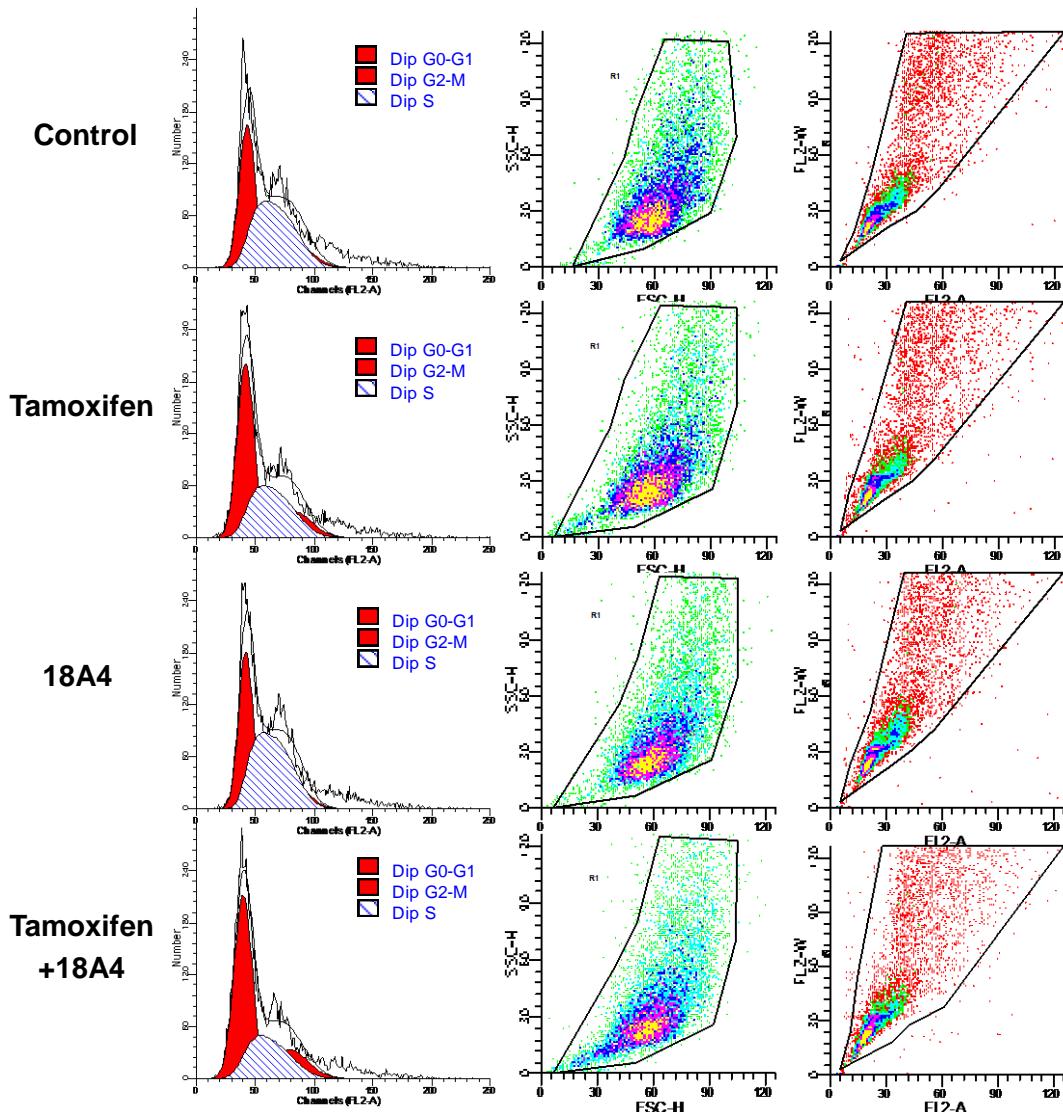


图 3-15 作用 24 小时流式细胞仪的检测结果

(18A4 浓度为 20 μ g/ml, 他莫昔芬浓度为 3 μ M)

作用 24 小时, MCF-7 细胞周期分布如图 3-16 所示。

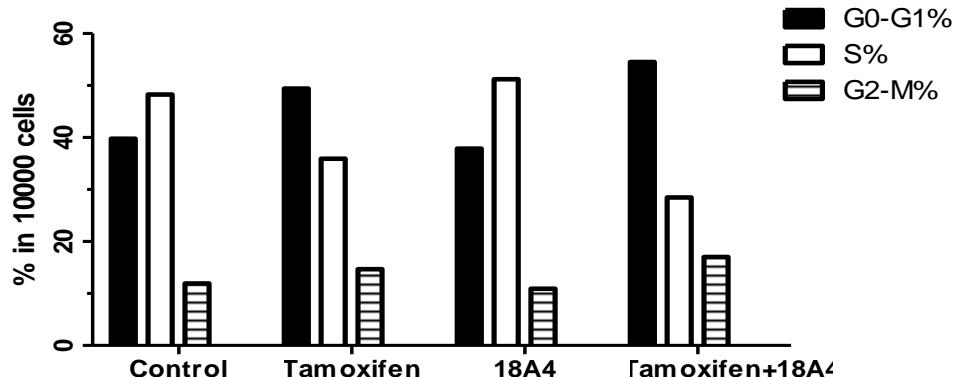


图 3-16 作用 24 小时 MCF-7 细胞的周期分布

综合分析三个时间点 MCF-7 细胞周期中的 G0-G1 期的比例, 如图 3-17 所示。

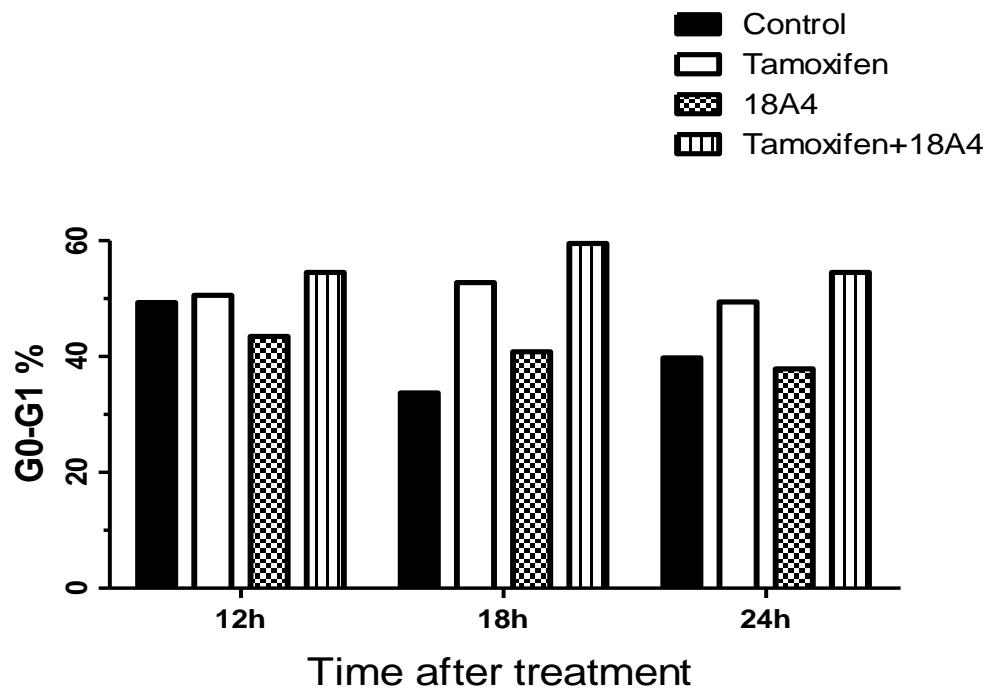


图 3-17 单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用增加了 MCF-7 细胞 G0-G1 期比例

分析图 3-17 的结果, 在作用 12 小时后, 对照组的 G0-G1 期占 49.31%, 单用他莫昔芬增加至 50.57%, 单用 18A4 减少至 43.49%, 联合用药时 G0-G1 期增加至 54.5%, 比单用他莫昔芬增加了 3.9%; 在作用 18 小时后, 对照组的 G0-G1 期占 33.72%, 单用他莫昔芬增加至 52.76%, 单用 18A4 减少至 40.81%, 联合用药时 G0-G1 期增加至 59.52%, 比单用他莫昔芬增加了 6.76%; 在作用 24 小时后, 对照组的 G0-G1 期占 39.8%, 单用他莫昔芬增加至 49.4%, 单用 18A4 减少至 37.88%, 联合用药时 G0-G1 期增加至 54.53%, 比单用他莫昔芬增加了 5.13%。

综上所述，单克隆抗体 18A4 能够增加他莫昔芬对乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期阻滞的作用，增加 G0-G1 期的比例。这种调控的增强作用与用药的时间有关，从实验结果看，在作用 18 小时后 G0-G1 期的增加达到高峰，作用 24 小时后有所减退，这规律与他莫昔芬对 MCF-7 细胞周期的阻滞作用相似。单克隆抗体 18A4 联合他莫昔芬对于 MCF-7 细胞周期的调控可能是联合用药抑制 MCF-7 细胞生长的药理学机制之一。

3.4 本章小结

本章主要展示了本项研究的结果和针对这些结果的客观分析。

在单克隆抗体 18A4 的制备、纯化和性质表征上，本章展示了用考马斯亮蓝 G250 法测定单克隆抗体 18A4 的浓度，并用 SDS-PAGE 法进行了验证，同时说明单克隆抗体 18A4 具有较高的纯度；用 Western Blot 比较从小鼠腹水中纯化的抗体与杂交瘤细胞上清中的抗体的浓度，说明选择从小鼠腹水中纯化能获得更高浓度的抗体；用非竞争性和竞争性 ELISA 法测定了 18A4 的表观亲和力。

在 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤细胞生长的影响上，本章展示了联合用药对乳腺癌细胞 MCF-7 和卵巢癌细胞 SKOV-3 的生长的抑制作用，其作用与他莫昔芬的浓度有关。用等效图线法说明单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬对 MCF-7 生长的抑制作用没有交叉影响。

在 18A4 与他莫昔芬联用抑制肿瘤生长的可能药理学机制上，本章展示了用流式细胞技术在用药后不同的时间点检测 MCF-7 细胞周期的变化，说明了单克隆抗体 18A4 能增强他莫昔芬对 MCF-7 细胞的 G0-G1 期的阻滞作用，并且强度与作用时间有关。

综上所述，本章通过系统性地展示研究结果和客观地分析数据，针对 AGR2 单克隆抗体联合他莫昔芬抑制肿瘤细胞生长的课题，从现象到部分机制进行了合理的解释。

第四章 讨论

4.1 单克隆抗体 18A4 的质量标准日趋完善

本项研究首先涉及单克隆抗体 18A4 的制备、纯化和性质表征，尝试通过实验室研究逐步建立单克隆抗体 18A4 的质量标准。

单克隆抗体 18A4 作为潜在的治疗性单克隆抗体，已经有同类药物在国内上市，如注射用抗人 T 细胞 CD3 鼠单抗。2010 年版的《中国药典》收录了注射用抗人 T 细胞 CD3 鼠单抗的质量标准主要包括“基本要求”、“制造”、“检定”、“保存运输及有效期”和“使用说明”等几项，其中“检定”是质量标准的主体，主要包括腹水检定、原液检定、半成品检定和成品检定等几项^[7]。单克隆抗体 18A4 在从小鼠腹水纯化后，相当于原液，可以参考“原液检定”一项建立质量标准。

注射用抗人 T 细胞 CD3 鼠单抗的“原液检定”项下主要有蛋白质含量、PH 值、等电点、纯度、小鼠骨髓瘤 DNA 残留等五个项目。蛋白质含量主要使用凯氏定氮法、Lowry 法、双缩脲法等；等电点采用等电聚焦法；纯度主要采用 SDS-PAGE 法和高效液相色谱法。

单克隆抗体 18A4 的性质检定本文中主要涉及浓度（蛋白质含量）、表观亲和力两项，与药典的标准相比，有可取之处，也有需要改进之处。

蛋白质含量首先采用考马斯亮蓝 G250 法，类似于 Lowry 法，能在低浓度的情况下测出蛋白含量，但是不是药典附录收载的法定方法。我建议改为 Lowry 法或双缩脲法，适用于测定 1-10mg 的蛋白浓度；由于加热会使抗体分解，凯氏定氮法则不适合单克隆抗体的浓度测定。

本文又采用了 SDS-PAGE 法验证了 18A4 浓度测定结果，同时说明了纯度，这和药典附录中收载的方法类似，可以直接归在“纯度”项下，但是高效液相色谱法更为精确，建议辅助采用。

亲和力测定主要在注射用抗人 T 细胞 CD3 鼠单抗的“腹水检定”项下提出，本文中使用非竞争性 ELISA 测定了腹水和纯化后的抗体的表观亲和力，能够说明纯化对于抗体表观亲和力的影响，是高于药典标准的。

单克隆抗体 18A4 的性质鉴定中，还有 PH 值、等电点、小鼠骨髓瘤 DNA 残留等项目未涉及。我认为，PH 值最好采用 PH 计测定，等电点使用等电聚焦结合 SDS-PAGE 的二维电泳进行实施，小鼠骨髓瘤 DNA 残留则可以用特异性引物通过定量 PCR 检测。

单克隆抗体 18A4 的质量标准与同类药物的比较如表 4-1 所示。

表 4-1 单克隆抗体 18A4 的质量标准与同类药物的比较

项目	单克隆抗体 18A4	注射用抗人 T 细胞 CD3 鼠单抗
蛋白质浓度	考马斯亮蓝 G250 法	Lowry 法、双缩脲法
纯度	SDS-PAGE 法、Western Blot	SDS-PAGE 法、HPLC
表观亲和力	非竞争性 ELISA、竞争性 ELISA	未涉及
PH 值、等电点	未涉及	等电聚焦
小鼠骨髓瘤 DNA 残留	未涉及	定量 PCR

综上所述，单克隆抗体 18A4 的质量标准日趋完善，本文已经完成了主要的蛋白质含量、纯度、表观亲和力等项的测定，其中的某些方法需要改进，还需增加 PH 值、等电点、小鼠骨髓瘤 DNA 残留等项使质量标准更加丰满。

4.2 18A4 与他莫昔芬的联用抑制了肿瘤细胞的生长

根据第三章 3.2 节中所述的实验结果和相关的分析，单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬的联用能够抑制肿瘤细胞的生长，同时也体现出以下几个特点。

4.2.1 细胞选择性

从单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤细胞生长影响的实验结果分析，两种药物联用能够抑制乳腺癌细胞 MCF-7 和卵巢癌细胞 SKOV-3 细胞的生长，但是这种抑制作用是有细胞选择性的。

一方面，抑制作用的细胞选择性体现在肿瘤细胞表面受体的表达水平。本研究选用的两种细胞系均为雌激素受体阳性的，这决定了他莫昔芬对这些细胞的生长原本就有一定的抑制作用。如果为雌激素受体阴性的肿瘤细胞，这种增效作用有可能减弱，甚至消失。不只是雌激素受体，其他受体的表达水平也对药物的敏感性起到了作用，如 Arpino Grazia 等在 2005 年就报道了孕酮受体阴性表达（progesterone receptor negative, PR-negative）对于雌激素受体阳性的乳腺癌细胞产生他莫昔芬耐药性的影响^[78]。肿瘤细胞表面受体的表达水平的差异使得联合疗法更有针对性，但是也限制了联合疗法的广泛使用。

另一方面，抑制作用的细胞选择性也体现在细胞对于药物的敏感性。即使是雌激素受体阳性的肿瘤细胞，对于他莫昔芬的敏感性也不同，因此增效作用产生的药物浓度也不同。SKOV-3 细胞对于他莫昔芬的耐药性就要比 MCF-7 强，这种现象在联合用药时也体现出来。实验结果显示，他莫昔芬在 $1\mu\text{M}$ 时与 18A4 联用对 MCF-7 细胞就能产生抑制细胞生长的增效作用；而对于 SKOV-3 则需要 $5\mu\text{M}$ 时才会产生相应的效果。因此，如果细胞对化疗药物越敏感，则需要化疗药物的浓度越低，单克隆抗体的浓度则可以自由选择。

综上所述，单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用时，应注意细胞的选择性，主要体现在肿瘤细胞表面受体的表达水平和对他莫昔芬的耐药性的情况。

4.2.2 浓度选择性

浓度选择性就是上一节提到的细胞对于药物的敏感性的延伸。从实验结果上看，联合用药的敏感性主要取决于他莫昔芬的浓度。对于 MCF-7 细胞，较高浓度的他莫昔芬药效过于明显，以至于将联用的增效作用掩盖；对于 SKOV-3 细胞，较低浓度的他莫昔芬与 18A4 联用无法产生药效。

浓度选择性提示在联合用药中各种药物的地位，他莫昔芬是主要的药物，18A4 是解决其耐药性的辅助疗法。

4.2.3 交叉影响低

等效图线法的研究结果显示了 18A4 与他莫昔芬的交叉影响，由于大部分的浓度组合均在参考直线 $x + y = 1$ 的上方，因此 18A4 与他莫昔芬的药效的交叉影响低。这项研究结果与 Ropero S. 等在 2004 年报道的曲妥珠单抗（Trastuzumab, Herceptin）与他莫昔芬联用具有较低的交叉影响^[79]类似。交叉影响低说明 18A4 与他莫昔芬联用从作用机制到代谢途径没有交叉影响，不易产生副作用，从侧面显示了联合疗法的安全性。

除了等效图线法，还有 Chou-Talalay 法^[80]等评价联合用药的交叉影响，选用等效图线法是因为它具有简明、易于操作的特点。等效图线法也存在缺陷，如假设 18A4 与他莫昔芬的药效是能够线性地相加的。评价联合疗法的安全性还需要更多的毒理学实验数据。

4.3 18A4 增强了他莫昔芬的细胞周期阻滞可能成为联合用药抑制肿瘤细胞生长的机制

根据第三章 3.3 节中所述的实验结果和相关分析，单克隆抗体 18A4 能够增强他莫昔芬对肿瘤细胞的细胞周期阻滞作用，增加了 G0-G1 期的比例，并呈现时间相关性。细胞周期阻滞的增强是联合用药抑制肿瘤细胞生长的可能药理学机制之一。

4.3.1 细胞周期阻滞的增强呈现时间相关性

根据 3.3 节的分析，18A4 与他莫昔芬联用后在用药后 12 小时、18 小时和 24 小时三个时间点 G0-G1 期相对于单用他莫昔芬有增加，且增加的程度有所不同，在 18 小时细胞周期阻滞作用达到高峰，24 小时有所下降。这与他莫昔芬对 MCF-7 细胞周期影响的时间相关性是相似的，差异性最大的最佳时间点是 16-18 小时^[53]。

时间相关性再次体现出联合用药中他莫昔芬是主角的地位，同时说明用药的时间也是联合用药治疗肿瘤需要考虑的重要参数之一。

4.3.2 联合用药抑制肿瘤生长可能存在其他机制

细胞周期的变化有可能与 Cyclin D 的信号通路有关，由于 AGR2 与多种与肿瘤生长、转移和耐药性相关的细胞因子和受体有关，以上机制一定不能完全解释 18A4 与他莫昔芬联用抑制肿瘤细胞生长的实验现象。

联合用药抑制肿瘤生长可能存在其他机制，进一步从基因和蛋白水平说明联合用药的机制，是本课题未来研究的发展方向之一。

4.4 18A4 与他莫昔芬联合成为新型抗肿瘤候选药物的前景展望

18A4 与他莫昔芬联用能够抑制肿瘤细胞的生长，其机制可能与细胞周期阻滞增强有关。在药效和机制上，18A4 与他莫昔芬的组合是很有希望成为新型抗肿瘤候选药物的。主要针对乳腺癌、卵巢癌等雌激素受体阳性的肿瘤，主要的目标是成为能够替代已上市的曲妥珠单抗（Trastuzumab, Herceptin）去解决他莫昔芬耐药性的有效补充疗法。

为了实现这个目标，这个联合疗法还需要克服 18A4 为鼠源抗体的弱点，抗体的人源化是一个有效的解决途径。目前，靶向 AGR2 的人源化单克隆抗体已经在研究中，这样就减少了免疫原性，符合单克隆抗体药物的发展方向。

4.5 本章小结

本章讨论了单克隆抗体 18A4 的质量标准、与他莫昔芬联用抑制肿瘤的生长及机制，并对此药物组合成为新型抗肿瘤候选药物的前景进行了展望。结合《中国药典》2010 版三部收载的注射用抗人 T 细胞 CD3 鼠单抗质量标准评价了单克隆抗体 18A4 的质量标准，并提出了改进意见。总结了 18A4 与他莫昔芬联用抑制肿瘤生长的几个特点，包括细胞选择性、浓度选择性、交叉影响低、细胞周期阻滞的时间相关性等，并猜测可能有多种药理学机制影响着药效，细胞周期阻滞只是其中的一种。从药效和机制上分析，18A4 与他莫昔芬的组合有望成为新型单克隆抗体候选药物，应该参考曲妥珠单抗（Trastuzumab, Herceptin）等已上市的能与他莫昔芬联用的药物，进行人源化改造，减小免疫原性，紧跟单克隆抗体药物的发展方向。

第五章 结论

本课题的研究内容主要涉及单克隆抗体 18A4 的制备、纯化和性质鉴定，单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用对肿瘤细胞生长的影响和可能的药理学机制。主要得出了如下结论。

从小鼠腹水中制备和纯化单克隆抗体 18A4，相对于杂交瘤细胞上清的途径，能够获得较高浓度和纯度的抗体。使用 Protein G Agarose 亲和纯化对于抗体表观亲和力的影响较小。单克隆抗体 18A4 能够特异性识别 AGR2，并具有较好的亲和力。单克隆抗体 18A4 的质量标准日趋完善，蛋白浓度、纯度、表观亲和力等检测方法和标准已经接近《中国药典》2010 版三部收载的同类药物，PH 值、等电点、小鼠骨髓瘤 DNA 残留等检测项目还需建立和完善。

单克隆抗体 18A4 联合他莫昔芬能抑制肿瘤细胞的生长。这种作用具有细胞选择性的特点，主要和细胞表面受体的表达水平有关。这种作用还具有浓度选择性的特点，主要和细胞对他莫昔芬耐药的程度有关，细胞的耐药程度越高，起到增效作用时需要的他莫昔芬浓度越高。这两个特点显示他莫昔芬在联合用药中的主要地位，而 18A4 是一种有效的辅助疗法。他莫昔芬与 18A4 对肿瘤细胞的药效交叉影响较小，显示此联合疗法具有较好的安全性。

联合用药抑制肿瘤细胞的生长可能存在多种机制。单克隆抗体 18A4 增强了他莫昔芬对肿瘤细胞周期的阻滞作用，可能是联合用药抑制肿瘤细胞生长的机制之一。18A4 与他莫昔芬联用使肿瘤细胞的 G0-G1 期增加，并呈现时间相关性，其趋势与他莫昔芬对肿瘤细胞周期的调控一致。时间相关性也显示了他莫昔芬在联合用药中的主要地位。

综上所述，18A4 与他莫昔芬的联合用药有望成为新型抗肿瘤候选药物组合。

本课题尚存在一些问题，有多个方面可以展开进一步研究。单克隆抗体 18A4 的质量标准中的一些项目还需建立和完善。单克隆抗体 18A4 与他莫昔芬联用在体内对肿瘤细胞生长的影响尚不明确，建议通过小鼠肿瘤移植模型进行研究。联合用药的机制和下游信号转导还不够明确，建议从与细胞周期有关的 Cyclin D 等细胞因子入手，从蛋白水平进行探究。

参考文献

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nature medicine, 1995, 1(1): 27-30.
- [2] Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, etc. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(26): 15149-15154.
- [3] Wall M E, Wani M C. Paclitaxel: from discovery to clinic[C]//ACS symposium series. Washington, DC: American Chemical Society,[1974]-, 1995, 583: 18-30.
- [4] Lodish et. Molecular Cell Biology (sixth edition)[M]. New York:W.H Freeman and Company,2006:1107
- [5] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2012, 62(1): 10-29.
- [6] 董志伟, 乔友林, 李连弟, 等. 中国癌症控制策略研究报告[J]. 中国肿瘤, 2002, 11(5): 250-260.
- [7] Sikora K, Advani S, Koroltchouk V, etc. Essential drugs for cancer therapy: a World Health Organization consultation[J]. Annals of Oncology, 1999, 10(4): 385-390.
- [8] 王黎红, 何华. 癌症疼痛的评估及护理对策[J]. 中华护理杂志, 2000, 35(8): 489-490.
- [9] McMillan S C, Weitzner M. Quality of life in cancer patients[J]. Cancer Practice, 1998, 6(5): 282-288.
- [10] 蒋学华. 临床药学导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 236.
- [11] Burger M M. A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1969, 62(3): 994-1001.
- [12] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, etc. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- [13] von Eschenbach A C, Buetow K. Cancer informatics vision: caBIG™[J]. Cancer informatics, 2006, 222.
- [14] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer[J]. cell, 2000, 100(1): 57-70.
- [15] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [16] Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress[J]. Nature Reviews Cancer, 2008, 8(6): 473-480.
- [17] Reichert J M. Monoclonal antibodies as innovative therapeutics[J]. Current pharmaceutical biotechnology, 2008, 9(6): 423-430.
- [18] Maggon K. Monoclonal antibody gold rush[J]. Current medicinal chemistry, 2007, 14(18): 1978-1987.
- [19] Schwartz G K. Combination Cancer Therapy: Modulators and Potentiators[M]. New York: Springer, 2005: V-Vi.

- [20] Mitchell M S. Immunotherapy as part of combinations for the treatment of cancer[J]. International immunopharmacology, 2003, 3(8): 1051-1059.
- [21] Zhao F, Edwards R, Dizon D, etc. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in AGR2-/- mice[J]. Developmental biology, 2010, 338(2): 270-279.
- [22] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, etc. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic acids research, 1998, 26(4): 1116-1123.
- [23] Thompson D A, Weigel R J. hAG-2, the Human Homologue of the Xenopus laevis Cement Gland Gene XAG-2, Is Coexpressed with Estrogen Receptor in Breast Cancer Cell Lines[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 251(1): 111-116.
- [24] Petek E, Windpassinger C, Egger H, etc. Localization1 of the human anterior gradient-2 gene (AGR2) to chromosome band 7p21. 3 by radiation hybrid mapping and fluorescencein situ hybridisation[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2000, 89(3-4): 141-142.
- [25] Shih L J, Lu Y F, Chen Y H, etc. Characterization of the agr2 gene, a homologue of X. laevis anterior gradient 2, from the zebrafish, Danio rerio[J]. Gene Expression Patterns, 2007, 7(4): 452-460.
- [26] Myung J-K, Frischer T, Afjehi-Sadat L, etc. Mass spectrometrical analysis of the processed metastasis-inducing anterior gradient protein 2 homolog reveals 100% sequence coverage[J]. Amino acids, 2008, 35(2): 485-494.
- [27] Patel P, Clarke C, Barraclough D L, etc. Metastasis-promoting Anterior-gradient 2 protein has a dimeric thioredoxin fold structure and a role in cell adhesion[J]. Journal of molecular biology, 2013, 425(5): 929-943.
- [28] Persson S, Rosenquist M, Knoblauch B, etc. Diversity of the protein disulfide isomerase family: identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 36(3): 734.
- [29] Gupta A, Dong A, Lowe A W. AGR2 Gene Function Requires a Unique Endoplasmic Reticulum Localization Motif[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(7): 4773-4782.
- [30] Fritzsche F R, Dah E, Pahl S, etc. Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer[J]. Clinical cancer research, 2006, 12(6): 1728-1734.
- [31] Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A, etc. The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers[J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4838-4847.
- [32] Bu H, Bormann S, Schaefer G, etc. The Anterior Gradient 2 (AGR2) Gene Is Overexpressed in Prostate Cancer and May Be Useful as a Urine Sediment Marker for Prostate Cancer Detection[J]. Prostate, 2011, 71(6): 575-587.
- [33] Zhang J S, Gong A, Cheville J C, etc. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer[J]. Genes Chromosomes & Cancer, 2005, 43(3): 249-259.
- [34] Zhang Y, Forootan S, Liu D, etc. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients[J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2007, 10(3): 293-300.

- [35] Fritzsche F R, Dahl E, Dankof A, etc. Expression of AGR2 in non small cell lung cancer[J]. Histology and Histopathology, 2007, 22(7): 703-708.
- [36] Pizzi M, Fassan M, Balistreri M, etc. Anterior Gradient 2 Overexpression in Lung Adenocarcinoma[J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2012, 20(1): 31-36.
- [37] 金芳. AGR2 在慢性萎缩性胃炎和胃腺癌中的表达及其意义[J]. 内蒙古医学杂志, 2009, (6): 644-647.
- [38] Lepreux S, Bioulac - Sage P, Chevet E. Differential expression of the anterior gradient protein - 2 is a conserved feature during morphogenesis and carcinogenesis of the biliary tree[J]. Liver International, 2011, 31(3): 322-328.
- [39] Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, etc. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival[J]. Cancer research, 2008, 68(19): 7811-7818.
- [40] Liu D, Rudland P S, Sibson D R, etc. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas[J]. Cancer research, 2005, 65(9): 3796-3805.
- [41] Mackay A, Urruticoechea A, Dixon J M, etc. Molecular response to aromatase inhibitor treatment in primary breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(3): R37.
- [42] Ramachandran V, Arumugam T, Hwang R F, etc. AGR2/C4.4A Pathway - A Novel Target for PDAC[J]. Pancreas, 2011, 40(8): 1350-1351.
- [43] Ambolet-Camoit A, Bui L C, Pierre S, etc. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Counteracts the p53 Response to a Genotoxin by Upregulating Expression of the Metastasis Marker AGR2 in the Hepatocarcinoma Cell Line HepG2[J]. Toxicological Sciences, 2010, 115(2): 501-512.
- [44] Hrstka R, Hublarova P, Brychtova V, etc. AGR2 protein expression contributes to tumour behaviour via p53 inhibitory effect[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2011, 28S28-S28.
- [45] Adolph T-E, Niederreiter L, Blumberg R S, etc. Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation[J]. Digestive Diseases, 2012, 30(4): 341-346.
- [46] Niederreiter L, Kaser A. Endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease[J]. Acta Gastro-Enterologica Belgica, 2011, 74(2): 330-333.
- [47] Vanderlaag K E, Hudak S, Bald L, etc. Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and survivin[J]. Breast Cancer Research, 2010, 12(3): R12.
- [48] 武正华, 朱奇, 崔光伟, 等. 抗 AGR2 单克隆抗体的制备, 鉴定及初步应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, (001): 49-51.
- [49] Sneader W. Drug discovery: a history[M]. New York: Wiley-Interscience, 2005: 472.
- [50] Baum M, Brinkley D, Dossett J, etc. Improved survival among patients treated with adjuvant tamoxifen after mastectomy for early breast cancer[J]. Lancet, 1983, 2(8347): 450.
- [51] Boocock D J, Maggs J L, White I N H, etc. α -Hydroxytamoxifen, a genotoxic metabolite of tamoxifen in the rat: identification and quantification in vivo and in vitro[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(1): 153-160.

- [52] Borges S, Desta Z, Li L, etc. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: Implication for optimization of breast cancer treatment&ast[J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2006, 80(1): 61-74.
- [53] Taylor I W, Hodson P J, Green M D, etc. Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells[J]. Cancer research, 1983, 43(9): 4007-4010.
- [54] Sutherland R L, Green M D, Hall R E, etc. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0-G1 phase of the cell cycle[J]. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 1983, 19(5): 615-621.
- [55] Nawata H, Bronzert D, Lippman M E. Isolation and characterization of a tamoxifen-resistant cell line derived from MCF-7 human breast cancer cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(10): 5016-5021.
- [56] Connor C E, Norris J D, Broadwater G, etc. Circumventing tamoxifen resistance in breast cancers using antiestrogens that induce unique conformational changes in the estrogen receptor[J]. Cancer research, 2001, 61(7): 2917-2922.
- [57] Osborne C K, Coronado E, Allred D C, etc. Acquired tamoxifen resistance: correlation with reduced breast tumor levels of tamoxifen and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1991, 83(20): 1477-1482.
- [58] Berry D A, Muss H B, Thor A D, etc. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2000, 18(20): 3471-3479.
- [59] Block M, Gründker C, Fister S, etc. Inhibition of the AKT/mTOR and erbB pathways by gefitinib, perifosine and analogs of gonadotropin-releasing hormone I and II to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells[J]. International journal of oncology, 2012, 41(5): 1845-1854.
- [60] de Leeuw R, Flach K, Toaldo C B, etc. PKA phosphorylation redirects ER α to promoters of a unique gene set to induce tamoxifen resistance[J]. Oncogene, 2012, 1-9.
- [61] Bostner J, Waltersson M A, Fornander T, etc. Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer[J]. Oncogene, 2007, 26(49): 6997-7005.
- [62] Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A, etc. The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers[J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4838-4847.
- [63] Suter T, Cook-Bruns N, Barton C. Cardiotoxicity associated with trastuzumab (Herceptin) therapy in the treatment of metastatic breast cancer[J]. The Breast, 2004, 13(3): 173-183.
- [64] Hiscox S, Morgan L, Barrow D, etc. Tamoxifen resistance in breast cancer cells is accompanied by an enhanced motile and invasive phenotype: Inhibition by gefitinib (Iressa', ZD1839)[J]. Clinical and Experimental Metastasis, 2004, 21(3): 201-212.
- [65] Long B, McKibben B, Lynch M, etc. Changes in epidermal growth factor receptor expression and response to ligand associated with acquired tamoxifen resistance or oestrogen independence in the ZR-75-1 human breast cancer cell line[J]. British journal of cancer, 1992, 65(6): 865.

- [66] Riggins R B, Thomas K S, Ta H Q, etc. Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b[J]. *Cancer research*, 2006, 66(14): 7007-7015.
- [67] Bartucci M, Morelli C, Mauro L, etc. Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Cancer research*, 2001, 61(18): 6747-6754.
- [68] Fagan D H, Uselman R R, Sachdev D, etc. Acquired Resistance to Tamoxifen Is Associated with Loss of the Type I Insulin-like Growth Factor Receptor: Implications for Breast Cancer Treatment[J]. *Cancer research*, 2012, 72(13): 3372-3380.
- [69] Witters L M, Kumar R, Chinchilli V M, etc. Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody[J]. *Breast cancer research and treatment*, 1997, 42(1): 1-5.
- [70] Argiris A, Wang C X, Whalen S G, etc. Synergistic interactions between tamoxifen and trastuzumab (Herceptin)[J]. *Clinical cancer research*, 2004, 10(4): 1409-1420.
- [71] Wang C X, Koay D C, Edwards A, etc. In vitro and in vivo effects of combination of Trastuzumab (Herceptin) and Tamoxifen in breast cancer[J]. *Breast cancer research and treatment*, 2005, 92(3): 251-263.
- [72] Cohen B D, Baker D A, Soderstrom C, etc. Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871[J]. *Clinical cancer research*, 2005, 11(5): 2063-2073.
- [73] Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. *Journal of immunological methods*, 1987, 100(1): 173-179.
- [74] Minto C F, Schnider T W, Short T G, etc. Response surface model for anesthetic drug interactions[J]. *Anesthesiology*, 2000, 92(6): 1603-1616.
- [75] Tallarida R J. The interaction index: a measure of drug synergism[J]. *Pain*, 2002, 98(1): 163-168.
- [76] Hua W, Christianson T, Rougeot C, etc. SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and antiestrogens[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 55(3-4): 279-289.
- [77] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版. 三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 314.
- [78] Arpino G, Weiss H, Lee A V, etc. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, 97(17): 1254-1261.
- [79] Ropero S, Abel Menéndez J, Vázquez-Martí A, etc. Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma[J]. *Breast cancer research and treatment*, 2004, 86(2): 125-137.
- [80] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer research*, 2010, 70(2): 440-446.

致辞

在毕业论文完成之际，怀着感恩的心，我首先想感谢我的父母和家人对我的照顾和关怀。在上海交通大学四年的学习生活中，在生活上他们教会我如何独立地生活，在思想上他们始终鼓励着我向着更高的人生目标攀登，在学习上他们给我美丽的鞭策。毫无疑问，我的父母和家人是我的大学生活中的坚强后盾，是我最需要感谢的人。

本论文是在李大伟教授的指导下完成的，教授能在每次讨论实验设计和实验结果的过程中适时地给我指点，让我在研究中少走了很多弯路，也传授给我科学的思维方式和雷厉风行的行事作风。因此，在毕业论文完成之际，我想感谢教授在指导我的毕业设计中所付出的辛勤劳动。

本论文的完成离不开李大伟教授课题组的所有成员对我的帮助。武正华老师在实验设计阶段修改了我的实验方案，提出了许多宝贵的意见。杲光伟师兄在细胞培养方面对我的帮助很大。郭昊师兄在表观亲和力测定方面给了许多有用的建议，并在实验中帮助了我。朱奇师姐在 Western Blot 技术方面给了我许多帮助。同时还要感谢同样在实验室完成毕业设计的李东升同学、在实验室学习的本科生王中英、毛涵杰、周冰洁等同学。在此一并送上我的感谢。

我还想感谢药学院其他课题组的同学对本项研究的帮助。我想感谢齐念民教授课题组的硕士研究生刘少娇对我的流式细胞仪使用的培训和提供样品管。我也想感谢毛振民教授课题组的博士研究生赵萍赠送的碘化丙啶试剂。

我还需要感谢身边的同学，包括上海交通大学药学院 F0917101 班和复旦大学药学院 09 级的全体同学们，无论是在校学习，还是在交流生活中，你们是我大学生活中最宝贵的财富。我还想感谢密西根大学机械工程系的硕士研究生水欢怡同学对本文英文部分的修改。

毕业之际，我还想感谢母校和药学院对我的培养，在这里我学到了真本领，实现了自我的价值，我将继续在药学院努力学习，在药学院书写又一段新的辉煌！

THE COMBINATION OF MONOCLONAL ANTIBODY TARGETING AGR2 AND TAMOXIFEN INHIBITS HUMAN CARCINOMA CELL PROLIFERATION

Because of its high mortality, high morbidity and large influence on patients' living quality, cancer is one of the most significant diseases threatening human's health. There are a large number of complex mechanisms modulating cancer formation and growth in different development stages of cancer. Although cancer is difficult to cure due to the complex mechanisms, people have discovered and invented many new strategies of therapy to fight against cancer. Today's cancer therapies are huge in quantity and variety. However, these cancer therapies often lack specificity, which might lead to a lot of side-effects and problems. Acquired drug-resistance of cancer cells is one of the difficult problems after traditional chemotherapy. As a result, research and development for cancer therapies solving these problems are of importance.

Monoclonal antibody can specifically recognize its antigen and bind to it with high affinity. Thus, a therapeutic monoclonal antibody may cause fewer side-effects because of its high specificity. Combination therapy can aggregate the advantages of several drugs with different mechanism, which may reduce potential drug-resistance of cancer cells. Therefore, combination therapy involving monoclonal antibody has been one of the trends in the development of future cancer treatment strategies.

Tamoxifen is a traditional anti-cancer drug. This chemical drug is a selective estrogen receptor modulator (SERM). It binds to the estrogen receptor (ER) competitively. That is, it binds to the estrogen binding site of ER with no activation activity. By this means, Tamoxifen acts as an antagonist to cut off downstream signal transduction pathway of estrogen receptor and inhibit cancer cell growth. Unfortunately, some cancer cells may acquire Tamoxifen-resistance after a period of treatment by elevating several other pathways parallel to ER pathway, such as HER-2 pathway, IGFR pathway. Anterior Gradient-2 (AGR2) is one of the members of Protein Disulfide Isomerase (PDI) family. It has 175 amino acid residuals in its sequence and 4 alpha-helices and 4 beta-strands in its secondary structure. The role of AGR2 in cancer progression is becoming increasingly clear. This protein is over-expressed in several kinds of cancer cells. Over-expression of AGR2 is closely related to cancer proliferation, metastasis and Tamoxifen-resistance. The mechanism is still not fully understood, complicated by multiple cancer-related cell signals potentially connecting with AGR2. The pathways of AGR2 promoting cancer cell proliferation overlap with that of Tamoxifen-resistance. What's more, there have been some monoclonal antibodies combining with Tamoxifen used in breast cancer treatments. These evidences indicate the possibility of combining monoclonal antibody targeting AGR2 with Tamoxifen to overcome drug-resistance. 18A4 is a patented monoclonal antibody discovered in our laboratory that targets AGR2 using hybridoma technique.

I used several kinds of methods in this research. I tested the concentration of 18A4 with

Coomassie Brilliant Blue G250, the purity of 18A4 with SDS-PAGE, the apparent affinity of 18A4 with competitive and noncompetitive ELISA. I used Western Blot to compare the concentration of 18A4 from murine ascites source with the one from hybridoma cell culture source. I selected MTT assay to measure the influence of combination therapy on cancer cell proliferation. In MTT assay, I chose two cancer cell lines, human breast cancer cell MCF-7 and human ovarian cancer cell SKOV-3. Both the two cell lines are ER positive, while only MCF-7 is AGR2 positive. At the beginning of MTT assay, I treated the cancer cells with 18A4 and Tamoxifen separately to find an appropriate concentration for combination therapy. Then, I choose three best concentration of Tamoxifen to combine with 18A4. Finally, I analyzed the result with Isobone method to observe the cross-talk effect between 18A4 and Tamoxifen. To find the possible mechanism of combination therapy, I used flow cytometric technique to analyze the cell cycle percentage after treatments. I collected the cells at 12h, 18h and 24h after treatments. After dyeing the cells with propidium iodide (PI), I used BD flow cytometry to separate the cells. Finally, the software ModFit V3.0 analyzed cell cycle percentage of three phases automatically.

With the help of these methods, I achieved several results in this research.

On one hand, some results paved the way for the foundation of the quality criterion for 18A4. The concentrations of two 18A4 samples were 1.56 mg/ml and 0.36mg/ml respectively. I confirmed the results by comparing the densities of two 18A4 samples with the ones of standard BSA on SDS-PAGE gel. The SDS-PAGE results also showed that two 18A4 samples had good purity after Protein G agarose purification. To find a better way to prepare 18A4 with higher concentration, I compared the 18A4 concentration purified from murine ascites with the one purified from hybridoma cell culture by Western Blot assay. The result indicated that the former one was approximately 100 times higher than the later one. Thus, murine ascites could be a better source to prepare 18A4 with higher concentration. With these data, I compared the quality criterion of 18A4 with the one of an approved drug, murine anti-CD3 monoclonal antibody. The result was that concentration, purity and apparent affinity should be involved in the quality criterion of 18A4. Meanwhile, some other events such as PH value, isoelectric point, and murine DNA residual analysis should also be added. As a result, constructing an elegant quality criterion was not an easy job. Anyway, the data and analyses were an inspiring start.

On the other hand, I found the inhibiting effect on cancer cell proliferation by the combination of 18A4 and Tamoxifen, as well as one of the possible mechanisms of this effect. The data showed that the combination of 18A4 and 1 μ M Tamoxifen could significantly inhibit proliferation of human breast cancer cell MCF-7, while the combination of 18A4 and 5 μ M Tamoxifen could significantly inhibit proliferation of human ovarian cancer cell SKOV-3. Both MCF-7 cell and SKOV-3 cell were ER positive. These phenomena indicated that the inhibiting effect was related to not only the varieties of the cancer cells, but also the concentration of Tamoxifen. The Isobone Graph showed the cross-talk between the anti-cancer effects of 18A4 and Tamoxifen. The data spots representing the concentration fractions of the two drugs were all over the base line $x + y = 1$ on the Isobone Graph. As a result, the two drugs had few influence with each other, which confirmed the safety of combination therapy. To uncover the possible mechanisms of combination therapy, I used flow cytometric techniques to analysis the cell cycle percentage at 3 different moments after treatments. Tamoxifen alone could increase the G0-G1 phase percentage in the cell cycle of MCF-7 cells and prevent the cancer cell from growing. After combined with 18A4, the G0-G1 phase percentage increased more than Tamoxifen alone from

50.57% to 54.5% in 12 hours, 52.76% to 59.52% in 18 hours and 49.4% to 54.53% in 24 hours. All these data suggested that 18A4 increased cell cycle inhibition of Tamoxifen, which might be one of the mechanisms of combination therapy. Time of treatment might be potential influence on the cell cycle inhibition effect.

This research put forward some new ideas for research and development of novel cancer treatments.

Quality criterion construction is very important to a drug candidate, because an approved drug must have a feasible criterion. This research tried hard to construct the quality criterion for 18A4. I tested some data to show the future quality criterion should involve these events. I also used an approved antibody as reference to add some new events to the criterion. Data-testing combined with reference-collecting was a useful method to construct a quality criterion.

What's more, the drug effects are very important to a candidate, as well as the safety and possible mechanisms behind the effects. In this research, I used MTT assay to test the anti-proliferation effects of the combination therapy. I also used Isobone Graph and flow cytometric techniques to confirm safety and possible mechanism.

Look into the future, there are many further works to do based on this research. The quality criterion of 18A4 should be improved according to the suggestions given by this research. This research may involve some extra assays in vitro to confirm the anti-cancer effect of combination therapy, such as Transwell assay, cell wound-healing assay and so on. To test the effect of 18A4 and Tamoxifen combination in vivo, I recommend doing this experiment on mice Xenograft model. For the safety of combination therapy, further pharmacodynamic and pharmacokinetic data should be tested by LC-MS or capillary electrophoresis. The combination therapy has multiple mechanisms. I am looking forward to using Western Blot to further analysis the modulation of downstream cancer-related markers in MCF-7 cells or RT-PCR to find the connection between Tamoxifen treatments and AGR2 gene expression level in SKOV-3 cells. For 18A4 itself, a humanized antibody is a better choice as a new drug candidate as its fewer immunogenicity.

In one word, this research is relatively of significance. The results show the possibility of a monoclonal antibody targeting AGR2 combined with Tamoxifen to inhibit human carcinoma cell proliferation. This research will promote the establishment of the quality criterion of 18A4, as well as a series of combination anti-cancer therapies involving monoclonal antibody targeting AGR2 and chemical drugs.

Manuscript to *Molecular Cancer Therapeutics*

Monoclonal Antibody Targeting AGR2 Combined with Tamoxifen Inhibits Cancer Cell Proliferation by Cell Cycle Modulation

Hao Chen

Author's Affiliation: School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, China

Abstract

Cancer is one of the most important diseases threatening human's health. There are several kinds of therapies used in cancer treatments. Although these therapies are useful clinically, their lack of specificity may lead to drug-resistance of cancer cells. Monoclonal antibody has high specificity and fewer side-effects. Combination therapy can reduce potential drug-resistance. As a result, combination therapy involving monoclonal antibody has been one of the trends in the development of future cancer therapeutics. Tamoxifen is a traditional anti-cancer drug. It binds to the estrogen receptor competitively, blocking the function of Estrogen and inhibits cancer cell growth. However, some cancer cells may acquire Tamoxifen-resistance after a period of treatments. Anterior Gradient-2 (AGR2) is a protein over-expressed in several kinds of cancer cells. Over-expression of AGR2 is closely related to cancer proliferation, metastasis and Tamoxifen-resistance. 18A4 is an in-house patented monoclonal antibody targeting AGR2. This research reported the concentration and apparent affinity data of 18A4. These data suggested that murine ascites could be a better source to prepare 18A4 with higher concentration. The combination of 18A4 and Tamoxifen could inhibit proliferation of human breast cancer cell MCF7 and human ovarian cancer cell SKOV3. The cell cycle percentage of cancer cells increased in G0-G1 phase 18 hours after treatment. Therefore, 18A4 increasing cell cycle inhibition of Tamoxifen was the possible mechanism in this combination therapy. In conclusion, this research suggests that combination of 18A4 and Tamoxifen is a promising therapeutic strategy against ER-positive cancer.

Introduction

Because of its high mortality, high morbidity and large influence on patients' living quality, cancer has been one of the most significant diseases threatening human's health and living quality. There are a large number of complex mechanisms modulating its growth in the life cycle of cancer. Today's cancer therapies are huge in quantity and variety. However, these cancer therapies often lack specificity, which might lead to a lot of side-effects. Acquired drug-resistance of cancer cells is one of the side-effects after traditional chemotherapy. As a result, research and development for cancer therapies solving these problems are of importance.

Monoclonal antibody can specifically recognize its antigen and bind to it with high affinity. Thus, monoclonal antibody may cause fewer side-effects for its specificity. Combination therapy can aggregate the advantages of several drugs with different mechanism, which may reduce potential drug-resistance of cancer cells. Therefore, combination therapy involving monoclonal antibody has been one of the trends in the development of future cancer therapeutics.

Tamoxifen is a traditional anti-cancer drug. It was first synthesized by Dora Richardson in 1966 and named ICI-46,474 at that time (1). The year 1971 saw the first clinical trial of Tamoxifen. This candidate achieved satisfactory effects on breast cancer patients. In 1977, Tamoxifen was approved by FDA. Three years later, the combination therapy of Tamoxifen combined with other chemical drugs was reported (2). Thus, Tamoxifen is possible to be involved in combination cancer therapeutics.

Tamoxifen is a selection estrogen receptor modulator. It binds to the Estrogen Receptor (ER) competitively with no activity, occupying the binding site of Estrogen. By this means, Tamoxifen can cut off downstream signal transduction pathway of Estrogen Receptor and inhibit cancer cell growth. Cell cycle modulation is one of the mechanisms behind the anti-cancer activity of Tamoxifen. Tamoxifen can inhibit the cell cycle progression of cancer cells and increase the percentage of G0-G1 phase (3, 4) and inhibit cancer cell proliferation. Unfortunately, some cancer cells may acquire Tamoxifen-resistance after a period of treatment by elevating several other pathways parallel to ER pathway, such as HER-2 pathway(5), EGFR pathway(6, 7) and IGFR pathway(8, 9).

Anterior Gradient-2 (AGR2) is one of the members of Protein Disulfide Isomerase (PDI) family. It has 175 amino acid residuals in its sequence and 4 alpha-helices and 4 beta-brands in its secondary structure (10, 11). The role of AGR2 in cancer progression is becoming increasingly clear. This protein is over-expressed in several kinds of cancer cells, such as breast cancer (12, 13), lung cancer (14, 15) and prostate cancer (16-18). Over-expression of AGR2 is closely related to cancer proliferation (19), migration (20) and Tamoxifen-resistance (21, 22). The mechanism is still covered, because multiple cancer-related cell signals have connection with AGR2. Some articles reported that AGR2 downstream signal is related to cyclin D1, Estrogen Receptor-alpha and survivin (23).

As a result, the pathway of AGR2 promoting cancer cell proliferation has overlap with the one of Tamoxifen-resistance. What's more, there have been some monoclonal antibodies combining with Tamoxifen used in breast cancer treatments, such as Trastuzumab (24-26), anti-IGFR monoclonal antibody named CP-751,871(27). These two evidences indicate the possibility of combining monoclonal antibody targeting AGR2 with Tamoxifen to overcome drug-resistance. 18A4 is an in-house patented monoclonal antibody targeting AGR2.

In this research, we reported the concentration data of 18A4 tested by Western Blot and the apparent affinity data tested by non-competitive ELISA. These data suggested that murine ascites could be a better source to prepare 18A4 with higher concentration than purifying directly from the hybridoma cell culture. In vitro, the combination of 18A4 and Tamoxifen could inhibit proliferation of human breast cancer cell MCF7 and human ovarian cancer cell SKOV3. Furthermore, this research reported that the cell cycle percentage of cancer cells increased more in G0-G1 phase than Tamoxifen alone 18 hours after combination therapy treatment. 18A4 increasing cell cycle inhibition of Tamoxifen was the possible mechanism in this combination therapy.

This research demonstrated the possibility of 18A4, a monoclonal antibody targeting AGR2 combined with Tamoxifen to inhibit human carcinoma cell proliferation by cell cycle modulation. Combination of 18A4 and Tamoxifen is a promising therapeutic strategy against ER-positive cancer. Look into the future, this research will promote a series of combination anti-cancer therapies involving monoclonal antibody targeting AGR2 and chemical drugs.

Material and Methods

Chemicals

Tamoxifen Citrate was purchased from Kasei Chemical Limited, Tokyo, Japan. For *in vitro* study, Tamoxifen Citrate was dissolved in Ethanol at the concentration of 10 mM as the stock solution. Antibodies for western blot and ELISA were purchased from Lian Ke Biotech, Shanghai, China. Chemicals for cytotoxicity assay were purchased from SolarBio, Beijing, China. Chemicals for cell cycle analysis were given as a present by Zhao Pin, a PhD student in School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University. Monoclonal antibody 18A4 was prepared by affinity purification column purchased from Thermo Scientific.

Cell culture

MCF7 and SKOV3 cell lines were from American Type Culture Collection (ATCC). All cells were cultivated in DMEM medium. DMEM medium was purchased from Gibco Life Technology. Culture media were supplemented with 10% new born calf serum (Biowest). Culture media for MCF7 should add additional Insulin from bovine pancreas at the concentration of 0.1U/ml. Insulin from bovine pancreas was from SolarBio, Beijing, China. Cell culture plates were purchased from Wohong Biotech, Shanghai, China.

Western blot analysis

18A4 purified from murine ascites and hybridoma cell culture was diluted for several concentrations. The proteins were resolved by SDS-PAGE, and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Secondary antibody from Lian Ke Biotech was used at working dilutions of 1:10,000. The result was recorded on X-ray film, Kodak for 3-10 minutes exposure.

Apparent affinity test

The non-competitive ELISA assay constructed by Beatty(28) was used in this research. The ELISA plates were coated with 5 μ g/ml AGR2-MBP fusion protein. 18A4 purified from murine ascites and hybridoma cell culture was diluted for several concentrations. These samples were added to the plates and incubated over night. The secondary antibody was diluted with 0.5% BSA (Geneview) by 1:10,000. The result was read at 450nm by microplate reader from Thermo Scientific.

Cytotoxicity assay

Cells were plated (2000 cells/well) in 96-well plates and allowed to recover for 24 hours. Subsequently, the dissolved drugs were added. After 48-hour exposure, the proportion of viable cells was determined by MTT assay following the manufacturer's recommendations (SolarBio, Beijing, China). The result was read at 490nm and 570nm by microplate reader from Thermo Scientific.

Cell cycle analysis

Cells (2×10^5 cells/well) were plated into 6-well plates and allowed to recover for 24 hours. After drug exposure for 12h, 18h and 24h, cells were collected, washed with PBS twice, fixed in 75% ice-cold ethanol, and stored at refrigerator over night. To analyze cell-cycle distribution, cells were transferred into PBS, washed twice, followed by 30-minute treatment with 5 mg/ml propidium iodide (PI).

Fluorescence levels were analyzed by flow cytometry using FACS Calibur (Becton Dickinson and Company). The resulting DNA histograms were quantified using Modfit for Mac V3.0 software (Becton Dickinson and Company).

Statistical analysis

All data except cell cycle analysis were expressed as mean \pm SD. Results were analyzed and illustrated with GraphPad Prism (GraphPad Software, version 5). The statistical significance is described in the respective figure legends (*, P < 0.05).

Results

Murine ascites can be a better source to prepare 18A4 with higher concentration

The result of western blot analysis on the dilutions of 18A4 purified from murine ascites and hybridoma cell culture is shown in Figure 1.

The heavy chain band of 18A4 is at about 50KDa, and the light chain band of 18A4 is about 25KDa. The location of the bands is as expected. The heavy chain band of the 256 times dilution of 18A4 purified from murine ascites can be detected. While the heavy chain band of 18A4 purified from hybridoma cell culture can only be detected at 2 times dilution. What's more, comparing the band density of the two groups of samples, the heavy chain band density of the 128 times dilution of 18A4 purified from murine ascites is similar to the one of 18A4 purified from hybridoma cell culture.

Monoclonal antibody 18A4 has high affinity with AGR2

The result of apparent affinity test on 18A4 purified from hybridoma cell culture is shown in Figure 2A, and the one on 18A4 purified from murine ascites is shown in Figure 2B. The apparent affinity of 18A4 is calculated as the material and methods shown. The apparent affinity of 18A4 purified from hybridoma cell culture is 8.76×10^9 L/mol, and the one of 18A4 purified from murine ascites is 8.38×10^7 L/mol.

18A4 combined with Tamoxifen synergistically inhibits cancer cell proliferation

The result of Tamoxifen used alone at different concentrations inhibiting MCF7 cells proliferation is shown in Figure 3A. The result of 18A4 used alone at different concentrations inhibiting MCF7 cells proliferation is shown in Figure 3B. The IC₅₀ of Tamoxifen on MCF7 is about 10μM, and the one of 18A4 on MCF7 is about 25μg/ml.

The result of 18A4 and Tamoxifen combination therapy at three Tamoxifen concentrations inhibiting MCF7 cells proliferation is shown in Figure 3C. Tamoxifen at the concentration of 1μM, combined with 18A4 at 10μg/ml or 20μg/ml can significantly inhibit MCF7 cell proliferation, compared with the activity of using two drugs alone. Tamoxifen at the concentration of 3μM, combined with 18A4 at 20μg/ml can also have this synergic effect.

The result of Tamoxifen used alone at different concentrations inhibiting SKOV3 cells proliferation is shown in Figure 4A. The result of 18A4 used alone at different concentrations inhibiting SKOV3 cells proliferation is shown in Figure 4B. The IC₅₀ of Tamoxifen on SKOV3 is about 50μM, while 18A4 at all concentrations tested have no significant inhibition on SKOV3 cell proliferation.

The result of 18A4 and Tamoxifen combination therapy at three Tamoxifen concentrations inhibiting SKOV3 cells proliferation is shown in Figure 4C. Tamoxifen at the concentration of 5μM, combined with 18A4 at 5μg/ml, 10μg/ml or 20μg/ml can significantly inhibit SKOV3 cell proliferation, compared with the activity of using two drugs alone. Tamoxifen at the concentration of 3μM, combined with 18A4 at 10μg/ml or 20μg/ml can also have this synergic effect.

Effects of 18A4 on Tamoxifen-induced cancer cell cycle modulation

The results of MCF7 cell cycle distribution after Tamoxifen and 18A4 combination therapy

treatments are shown in Figure 5. The results of 12 hours after treatment are shown in Figure 5A, 18 hours after treatment in Figure 5B and 24 hours after treatment in Figure 5C. The statistic results of G0-G1 phase percentage of the cell cycle distribution are shown in Figure 6.

Tamoxifen alone can increase the G0-G1 phase percentage in the cell cycle of MCF7 cells and prevent the cancer cell from growing. After combined with 18A4, the G0-G1 phase percentage increases more than Tamoxifen alone from 50.57% to 54.5% in 12 hours, 52.76% to 59.52% in 18 hours and 49.4% to 54.53% in 24 hours.

Discussion

Tamoxifen is a traditional anti-cancer drug. It competitively blocks the Estrogen Receptor and inhibits cancer cell proliferation by cell cycle modulation. Some cancer cells may acquire Tamoxifen resistance because of multiple reasons. AGR2 is a protein over-expressed in several cancer cells and related to cancer growth, invasion and drug resistance. There are evidences indicating that AGR2 is related to Tamoxifen-resistance. Therefore, the combination therapy of Tamoxifen with a monoclonal antibody targeting AGR2 is a feasible strategy to overcome Tamoxifen-resistance.

The results show a better source for 18A4, the monoclonal antibody targeting AGR2 with higher concentration and affinity. Murine ascites can be the better source for purifying 18A4 with higher concentration than hybridoma cell culture. Comparing the apparent affinity of 18A4 from the two sources, there is 100 times loss of apparent affinity when choosing murine ascites as source, but the loss has little influence on the function of 18A4, which is shown in Figure 3B.

In vitro, the results show the synergic anti-cancer activity of the combination therapy of 18A4 and Tamoxifen. The data showed that the combination of 18A4 and 1 μ M Tamoxifen can significantly inhibit proliferation of human breast cancer cell MCF7, while the combination of 18A4 and 5 μ M Tamoxifen could significantly inhibit proliferation of human ovarian cancer cell SKOV3. This phenomenon indicates that the combination therapy is effective at different concentration of Tamoxifen when treated on different cell lines.

The cell cycle percentage of G0-G1 phase of combination therapy is increased more than the one of Tamoxifen used alone. The result indicates that 18A4 combined with Tamoxifen inhibits the cancer cell proliferation by cell cycle modulation.

In conclusion, the synergetic anti-cancer activity of 18A4 combined with Tamoxifen *in vitro* is clearly demonstrated. These results suggest that 18A4 combined with Tamoxifen can be a feasible combination anti-cancer therapeutics candidate. The mechanism behind cell cycle modulation effect should be further analyzed.

Acknowledgements

I want to give acknowledgements to Professor Dawei Li for his instruction. I want to thank all the members of our lab, including Wu Zhenghua, Gao Guangwei, Guo Hao, Zhu Qi and other undergraduates for their help to my research. Acknowledgements should also be sent to Zhao Pin and Liu Shaojiao for their help on flow cytometry.

References

1. Sneader, W., Drug discovery: a history. 2005, New York: Wiley-Interscience. 472.
2. Baum, M., et al., Improved survival among patients treated with adjuvant tamoxifen after

- mastectomy for early breast cancer. *Lancet*, 1983. **2**(8347): p. 450.
3. Taylor, I.W., et al., Effects of tamoxifen on cell cycle progression of synchronous MCF-7 human mammary carcinoma cells. *Cancer research*, 1983. **43**(9): p. 4007-4010.
4. Sutherland, R.L., et al., Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0-G1 phase of the cell cycle. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 1983. **19**(5): p. 615-621.
5. Berry, D.A., et al., HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2000. **18**(20): p. 3471-3479.
6. Long, B., et al., Changes in epidermal growth factor receptor expression and response to ligand associated with acquired tamoxifen resistance or oestrogen independence in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *British journal of cancer*, 1992. **65**(6): p. 865.
7. Riggins, R.B., et al., Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b. *Cancer research*, 2006. **66**(14): p. 7007-7015.
8. Bartucci, M., et al., Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer research*, 2001. **61**(18): p. 6747-6754.
9. Fagan, D.H., et al., Acquired Resistance to Tamoxifen Is Associated with Loss of the Type I Insulin-like Growth Factor Receptor: Implications for Breast Cancer Treatment. *Cancer research*, 2012. **72**(13): p. 3372-3380.
10. Myung, J.-K., et al., Mass spectrometrical analysis of the processed metastasis-inducing anterior gradient protein 2 homolog reveals 100% sequence coverage. *Amino acids*, 2008. **35**(2): p. 485-494.
11. Patel, P., et al., Metastasis-promoting Anterior-gradient 2 protein has a dimeric thioredoxin fold structure and a role in cell adhesion. *Journal of molecular biology*, 2013. **425**(5): p. 929-943.
12. Fritzsche, F.R., et al., Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2006. **12**(6): p. 1728-1734.
13. Hrstka, R., et al., The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene*, 2010. **29**(34): p. 4838-4847.
14. Fritzsche, F.R., et al., Expression of AGR2 in non small cell lung cancer. *Histology and Histopathology*, 2007. **22**(7): p. 703-708.
15. Pizzi, M., et al., Anterior Gradient 2 Overexpression in Lung Adenocarcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2012. **20**(1): p. 31-36.
16. Bu, H., et al., The Anterior Gradient 2 (AGR2) Gene Is Overexpressed in Prostate Cancer and May Be Useful as a Urine Sediment Marker for Prostate Cancer Detection. *Prostate*, 2011. **71**(6): p. 575-587.
17. Zhang, Y., et al., Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2007. **10**(3): p. 293-300.
18. Zhang, J.S., et al., AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2005. **43**(3): p. 249-259.

19. Ramachandran, V., et al., Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer Research*, 2008. **68**(19): p. 7811-7818.
20. Liu, D., et al., Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas. *Cancer Research*, 2005. **65**(9): p. 3796-3805.
21. Mackay, A., et al., Molecular response to aromatase inhibitor treatment in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(3): p. R37.
22. Hrstka, R., et al., The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene*, 2010. **29**(34): p. 4838-4847.
23. Vanderlaag, K.E., et al., Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and survivin. *Breast Cancer Research*, 2010. **12**(3): p. R12.
24. Wang, C.X., et al., In vitro and in vivo effects of combination of Trastuzumab (Herceptin) and Tamoxifen in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 2005. **92**(3): p. 251-263.
25. Argiris, A., et al., Synergistic interactions between tamoxifen and trastuzumab (Herceptin). *Clinical cancer research*, 2004. **10**(4): p. 1409-1420.
26. Ropero, S., et al., Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*, 2004. **86**(2): p. 125-137.
27. Cohen, B.D., et al., Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871. *Clinical cancer research*, 2005. **11**(5): p. 2063-2073.
28. Beatty, J.D., B.G. Beatty, and W.G. Vlahos, Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *Journal of immunological methods*, 1987. **100**(1): p. 173-179.

Figures

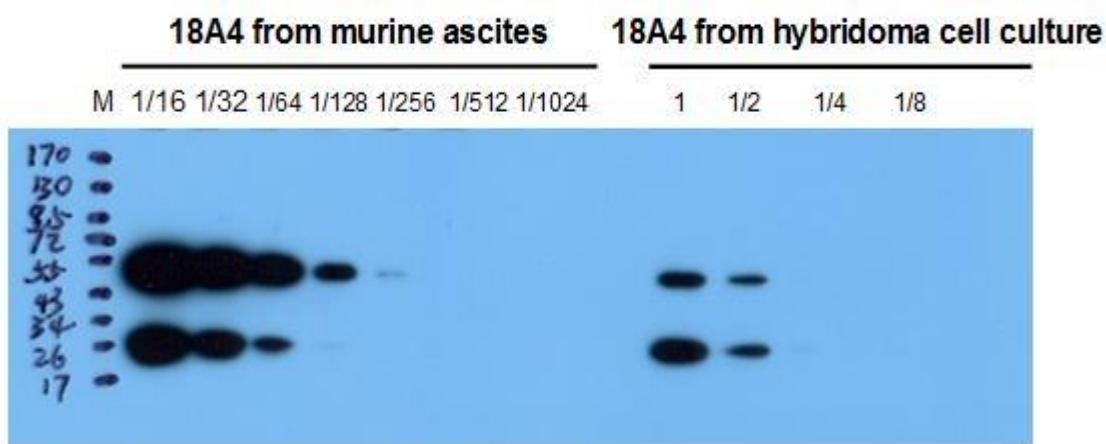


Figure 1 Comparison on the concentration of 18A4 purified from murine ascites with the one of 18A4 purified from hybridoma cell culture by Western Blot.

The two groups of samples were diluted with PBS to different concentration as the figure shown. The SDS-PAGE gel concentration was 12%. The protein was transferred to PVDF membrane. The secondary antibody was goat anti-mouse IgG (H+L) diluted for 1:10000 by 5% BSA solution. The X-ray film exposure time was 10 minutes.

Figures

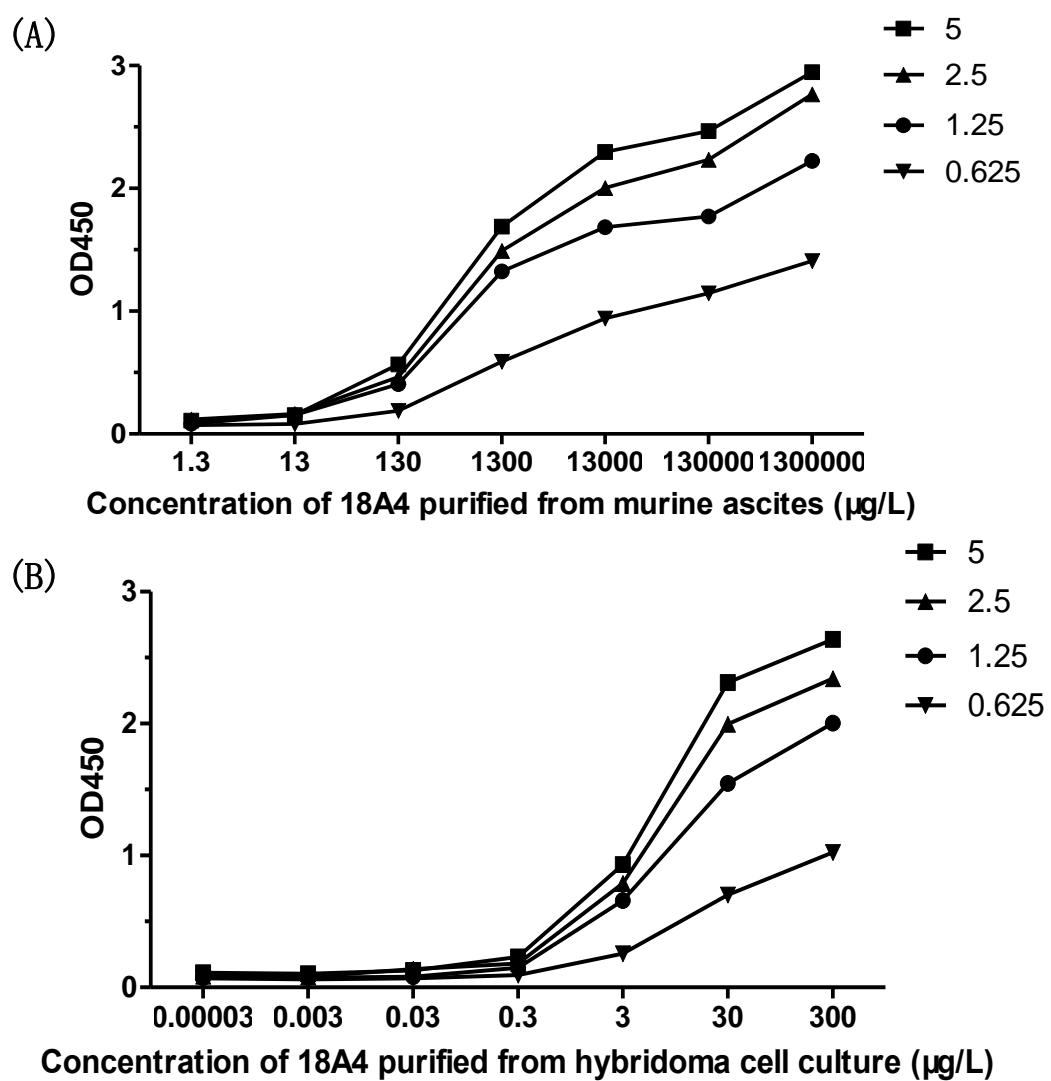


Figure 2 Different concentrations of 18A4 purified from murine ascites (A) and hybridoma cell culture (B) can bind with different concentrations of AGR2.

The two groups of samples were the same as in Figure 1. The two groups of samples were diluted with 0.5% BSA to different concentrations. The ELISA plates were coated with AGR2-MBP tag-purified antigen of four different concentrations. The secondary antibody was goat anti-mouse IgG (H+L) diluted for 1:10000 by 0.5% BSA solution. The negative control was C4 ascites and cell culture media separately. The OD values were already deducted the negative control values.

Figures

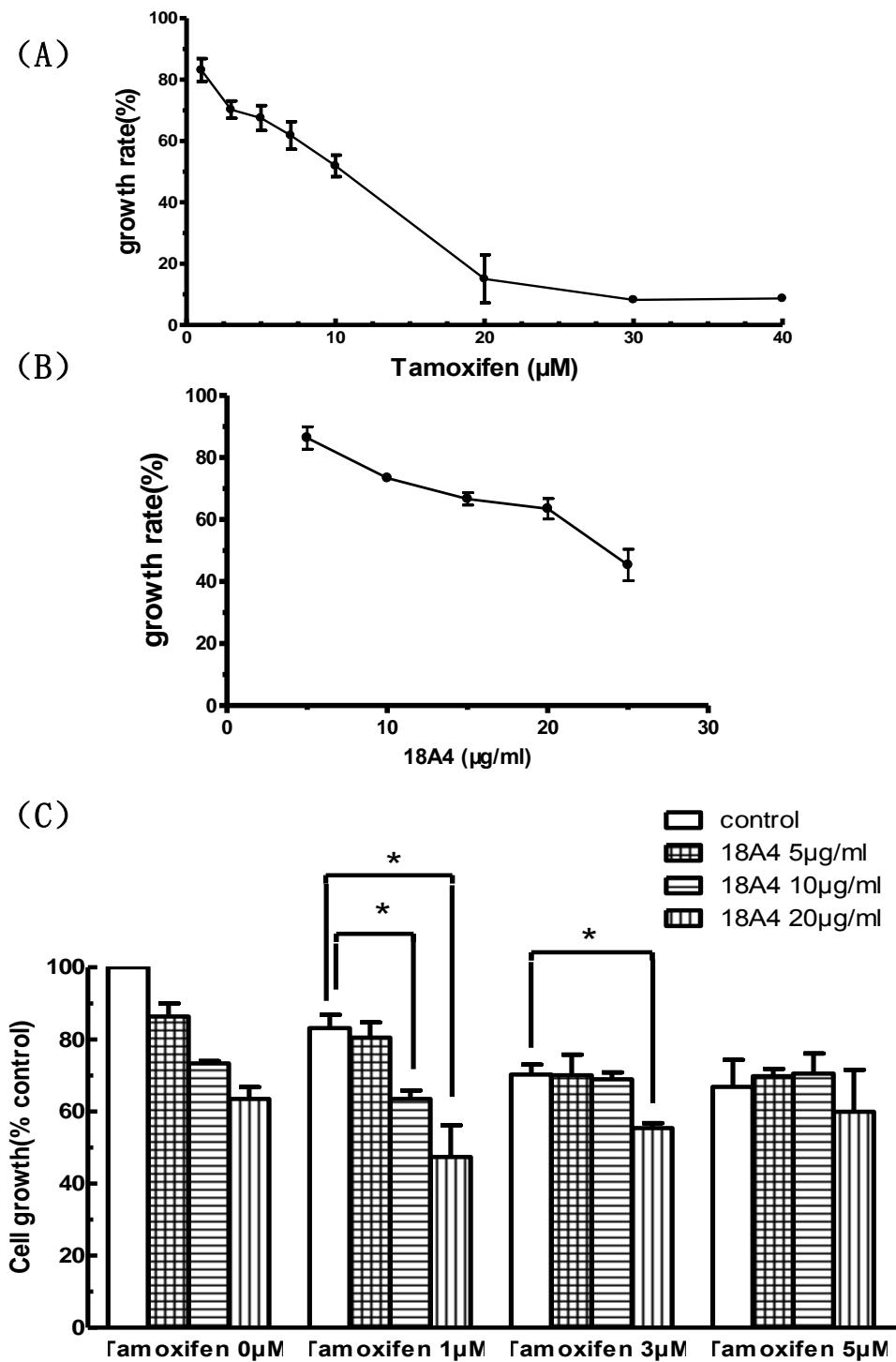


Figure 3 The impact of Tamoxifen (A), 18A4 (B) and combination therapy (C) on the proliferation of MCF7 cells.

The statistic was done by Two-way ANOVA. (*) on the figure represented significance of $P < 0.05$. The SD values were calculated by 5 parallel experiments. Cell growth rate (%) was calculated by the viability of drug-treated cell dividing the one of the non-drug-treated cell measured by MTT assay at 490nm.

Figures

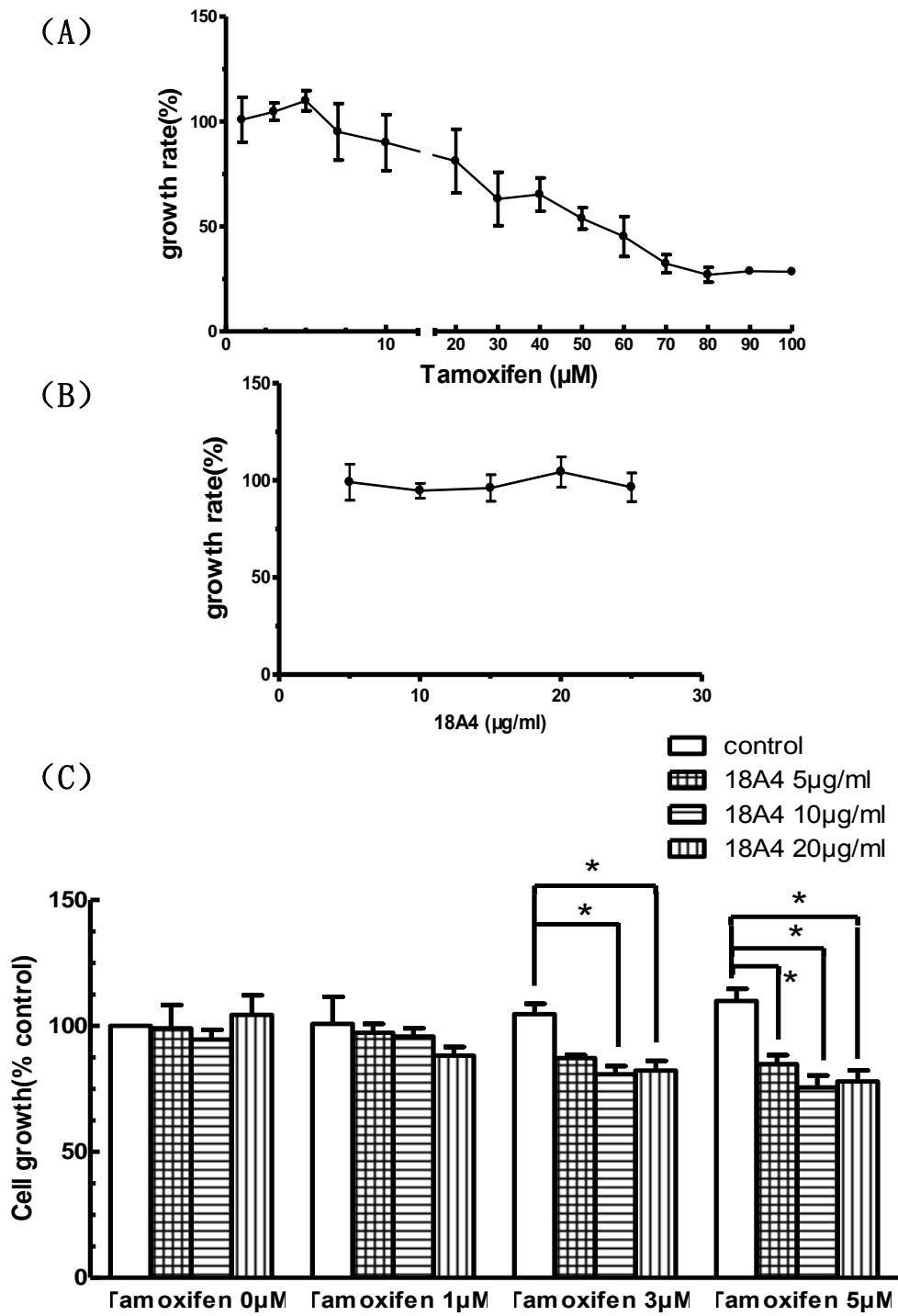


Figure 4 The impact of Tamoxifen (A), 18A4 (B) and combination therapy (C) on the proliferation of SKOV3 cells.

The statistic was done by Two-way ANOVA. (*) on the figure represented significance of $P < 0.05$. The SD values were calculated by 5 parallel experiments. Cell growth rate (%) was calculated by the viability of drug-treated cell dividing the one of the non-drug-treated cell measured by MTT assay at 490nm.

Figures

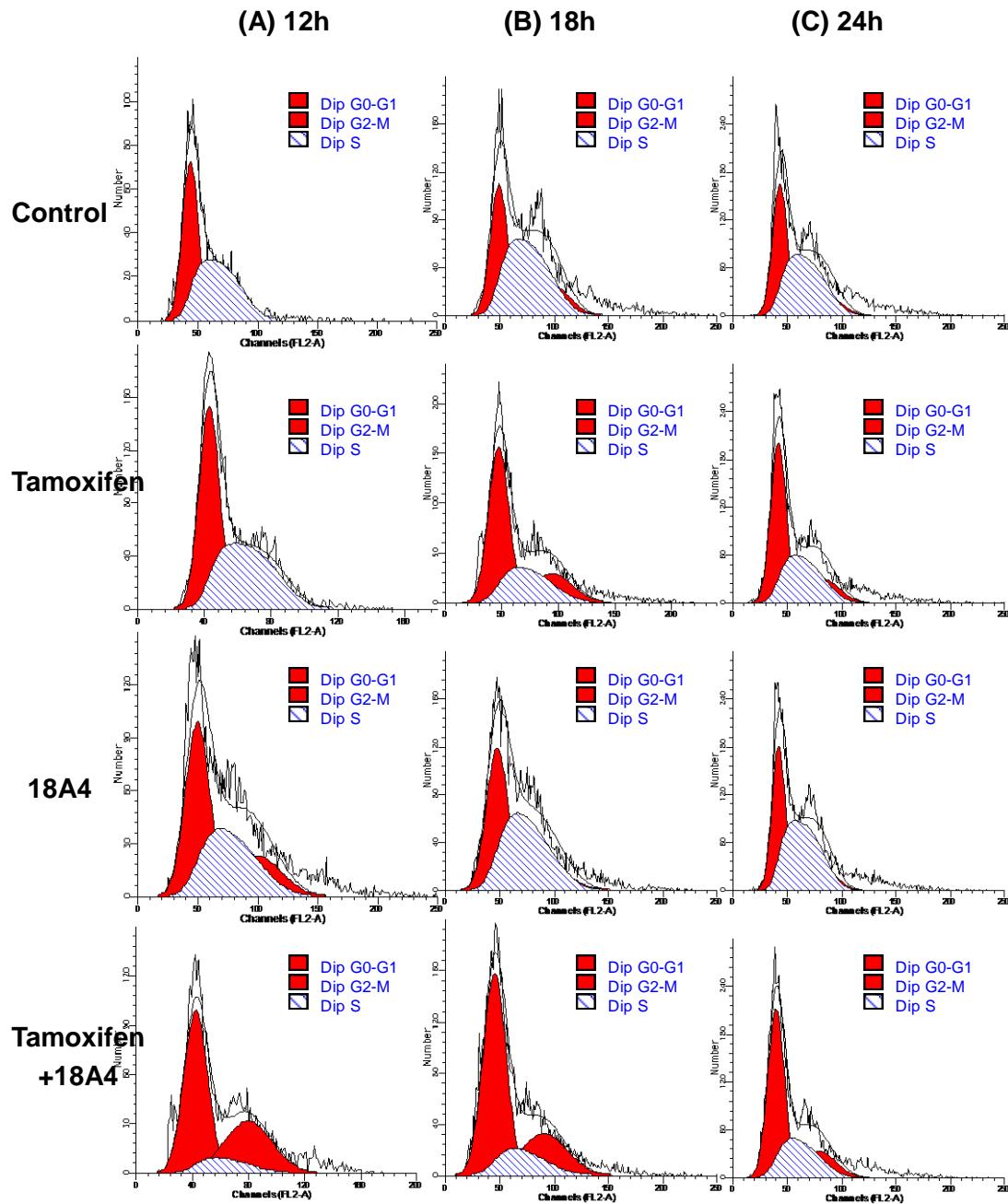


Figure 5 Flow cytometry showed the cell cycle distribution of MCF7 cells after combination treatments at 12 hours (A), 18 hours (B) and 24 hours (C).

Control was treated with media supplemented with 10% new born calf serum. Tamoxifen was used at the concentration of $3\mu\text{M}$, and 18A4 was used at the concentration of $20\mu\text{g}/\text{ml}$. The cells were collected, fixed with 75% ethanol and incubated with propidium iodide in room temperature for 30 minutes. The flow cytometry test was completed on the same day.

Figures

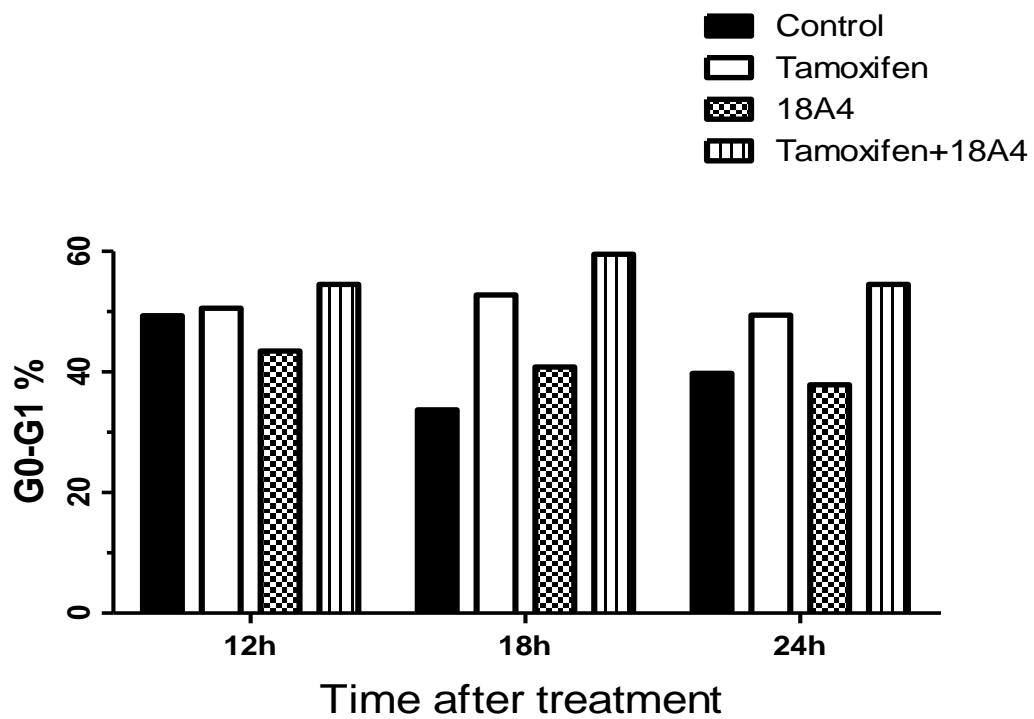


Figure 6 The combination therapy treated group had more G0-G1 phase percentage of the MCF7 cell cycle than control, Tamoxifen treated and 18A4 treated groups.

The G0-G1 phase was calculated automatically by the ModFit software described in material and methods. The values were calculated from cell cycle distributions shown in Figure 5.