

·综述·

## HER2 的表达及其分子影像的研究进展

汪文霞 兰晓莉 张永学

430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学分子影像研究所, 湖北省分子影像重点实验室, 教育部分子靶向治疗重点实验室

通信作者: 张永学, Email: zhyx1229@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.05.007

**【摘要】** 人表皮生长因子受体 2 (HER2) 是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体, 同时也是一种高表达于各种癌细胞的生物标志物。高表达 HER2 的肿瘤往往预后不良。HER2 分子影像主要是利用放射性核素、磁性材料、发光物质等标记配体能与 HER2 特异性结合的特性, 对患者体内 HER2 高表达病灶进行显像, 从而协助 HER2 阳性疾病的诊断, 筛选出抗 HER2 治疗有效的患者, 并可用于疗效评估, 是近年来肿瘤精准医疗研究的热点之一。

**【关键词】** 人表皮生长因子受体 2; 分子探针; 抗体, 单克隆; 分子显像; 纳米抗体

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 31630049

**Research and development of HER2 expression molecular imaging** Wang Wenxia, Lan Xiaoli, Zhang Yongxue

Hubei Province Key Laboratory of Molecular Imaging, Key Laboratory of Molecular Targeted Therapies of the Ministry of Education, Institute of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Union Hospital Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: Zhang Yongxue, Email: zhyx1229@163.com

**【Abstract】** Human epidermal growth factor receptor-2(HER2) is a kind of transmembrane receptor with tyrosine kinase activity, and also is a biomarker highly expressed in various cancer cells, often indicating poor clinical prognosis. HER2 expression molecular imaging mainly utilizes the labeled-ligands' ability of specific binding with HER2, such as radionuclide, magnetic materials and fluorescent substances, by which the high-HER2 expressed lesions are shown. This technique provides a strong support for diagnosing HER2-expressed diseases, selecting patients who are respondent to HER2-targeted therapy and evaluating the therapeutic effect, and has become one of the hot spots in the research of precise treatment of tumors in recent years.

**【Key words】** Human epidermal growth factor receptor-2; Molecular probe; Antibodies, monoclonal; Molecular imaging; Nanobody

**Fund program:** Key Program of National Natural Science Foundation of China(31630049)

近年来, 随着研究者对癌症发生发展的分子机制的认知不断深入, 在此基础上建立起来的生物靶向治疗也得到了进一步发展。人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 是一种高表达于各种癌细胞的生物标志物, 在癌症的发生、发展过程中起着重要作用。同时 HER2 也是生物靶向治疗的目标受体, 现有几种抗 HER2 的靶向药物如单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名: 赫赛汀) 和小分子抑制剂埃罗替尼 (erlotinib) 对高表达 HER2 的恶性肿瘤患者具有良好的疗效。但由于恶性肿瘤的异质性, 靶向治疗的临床应用很大程度上受限于

肿瘤生物标志物的有效检测, 虽然肿瘤切除术后的免疫组化分析可以获得肿瘤原发灶的生物学类型及 HER2 表达情况, 但对于不能切除的组织以及远处转移灶则无法获得其表达信息, 给生物靶向治疗带来困难。近年来建立的 HER2 表达分子影像技术是一项无创性检查, 能精准、安全、无创地获得全身 HER2 阳性表达的转移病灶, 从而为某些恶性肿瘤治疗方案的制订提供重要依据。

### 1 HER2 的表达及其意义

HER2 是 HER 家族 (HER1-4) 四大成员之一,

它们共同参与细胞生存、生长和分化的调节。1984年, Schechter 等<sup>[1]</sup>发现了 *HER2* 基因, 即 *c-erbB-2* 基因定位于 17 号染色体长臂 17q12), 编码相对分子质量为 185 000 的跨膜受体样蛋白, 具有酪氨酸激酶活性。*HER2* 受体的结构主要由 3 部分组成, 即胞内区、胞外区和跨膜区, 其中胞外区可与特异的配体分子结合致使酪氨酸残基磷酸化, 进而激活下游信号通路影响细胞的增殖与分化, 因此为肿瘤靶向治疗提供了可能性。虽然 *HER2* 没有任何已知的配体, 但常与家族其他成员组成异源二聚体, 在许多肿瘤发生发展中起着类似癌基因的作用, 其在乳腺癌中的研究最为深入。*HER2* 过度表达的结果包括促进细胞生长和增殖——肿瘤发生, 具有抑制细胞凋亡、诱导血管和淋巴管新生、提高细胞运动能力、增强肿瘤的浸润转移作用。

*HER2* 蛋白在多种正常组织如乳腺、胃肠道、呼吸道和泌尿生殖道上皮中呈低表达, 而其基因扩增和过表达存在于多种肿瘤组织中, 包括乳腺癌、胃/食管癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌和宫颈癌等。

### 1.1 乳腺癌

美国癌症协会最新数据显示, 乳腺癌发病率在女性恶性肿瘤中位居榜首<sup>[2]</sup>。近几年我国女性乳腺癌的发病率及病死率也呈逐年上升的趋势, 在女性癌症死因中排名第 6<sup>[3]</sup>。1985 年有报道称在人类乳腺癌细胞系 MAC117 中发现了 *HER2* 基因扩增<sup>[4]</sup>。1987 年, Slamon 等<sup>[5]</sup>对 189 例乳腺癌患者的研究发现, *HER2* 在 20%~25% 乳腺癌患者中过度表达, 且 *HER2* 基因扩增是乳腺癌的独立危险因素, 从而可预测患者的生存时间和复发时间。该研究表明, *HER2* 阳性患者的生存期比阴性者缩短一半以上, 转移灶 *HER2* 阳性的乳腺癌患者的中位生存期为 8~10 个月, 而 *HER2* 阴性者为 17~22 个月。一项包含 107 项 (共涉及 39 730 例患者) 有关乳腺癌患者 *HER2* 表达水平的荟萃分析也表明, 1987 年至 2009 年大部分研究 (95 项研究, 88%) 单变量或多变量分析均证实了不管是 *HER2* 基因扩增亦或 *HER2* 蛋白表达水平升高都可预示乳腺癌的发生, 且 *HER2* 水平与高侵袭性肿瘤关系密切<sup>[6]</sup>。还有研究发现, *HER2* 过度表达也见于乳腺内或乳腺外的 Paget's 病患者<sup>[7]</sup>。经免疫组化分析, 乳腺癌可根据雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕酮受体 pro-

gesterone receptor, PR)、*HER2* 和增殖相关抗原 Ki67 的表达情况分为多种不同亚型, 各种亚型对不同化疗药物的敏感性不同, 目前, 乳腺癌化疗的选择很大程度上是基于癌细胞对化疗药物敏感性的预测, 有研究提示, 与激素受体阴性 (ER/PR<sup>-</sup>) 伴 *HER2* 过表达或三阴 (ER/PR<sup>-</sup>、*HER2*<sup>-</sup>) 乳腺癌患者相比较, ER/PR<sup>+</sup>、*HER2*<sup>-</sup> 患者化疗效果较差, 但对激素治疗反应敏感; 此外, 新辅助化疗中加入抗 *HER2* 药物 (如曲妥珠单抗) 对 *HER2*<sup>+</sup> 乳腺癌的治疗有效<sup>[8]</sup>。总之, *HER2* 表达有别于肿瘤大小、淋巴结转移及激素受体, 是影响乳腺癌发生、进展、恶化的重要因素, 也是肿瘤复发和生存期长短的独立预后因子。*HER2* 高表达虽提示肿瘤恶性程度高、进展迅速、化疗缓解期短、预后不佳, 但同时也是临床应用曲妥珠单抗靶向治疗的前提和关键。

### 1.2 卵巢癌

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤之一, 病死率居妇产科恶性肿瘤的首位。据统计全球范围内每年新增卵巢癌患者 204 000 例 (占全部癌症病例的 4%), 病死人数为 125 000 例 (占全部癌症死亡人数的 4.2%)<sup>[9]</sup>; 尽管在过去几十年卵巢癌患者的平均生存时间稍有延长, 但其 5 年生存率仍保持在 50% 以下<sup>[10]</sup>。卵巢癌中也存在 *HER2* 基因扩增和蛋白质过表达, 表明 *HER2* 在卵巢癌的发生、发展及恶化中起着重要作用。目前众多学者对卵巢癌 *HER2* 的过表达尚有争议。多数认为 *HER2* 蛋白在约 15%~30% 的卵巢癌中过表达<sup>[11]</sup>, 在难治性、易复发的卵巢透明细胞腺癌 (CCA) 中, 其过表达率甚至超过 40%<sup>[12]</sup>, 但也有一些报道认为 *HER2* 在卵巢癌中的过表达率仅为 10% 左右<sup>[13]</sup>。Bookman 等<sup>[14]</sup>对 837 例卵巢癌患者的研究发现, 仅有 11.4% 为 *HER2* 阳性 (以 2+、3+ 记为阳性); 另一项 320 例卵巢癌样本的多中心研究发现, 仅 4.7% 的卵巢癌 *HER2* 阳性计分为 3+, 而用荧光原位杂交 (FISH) 技术测得 6.6% 的癌组织中存在 *HER2* 基因扩增<sup>[15]</sup>。卵巢癌中 *HER2* 表达水平不一可能与取材部位、时间、方式、检测方法以及评分系统不同有关。

有研究表明, *HER2* 表达水平高低与卵巢癌细胞分化程度有关, 低分化卵巢癌组织中 *HER2* 蛋白表达水平较高, 而高分化卵巢癌组织则与之相反<sup>[16]</sup>。有学者用免疫组化分析方法检测良性卵巢浆液性腺瘤、交界性腺瘤以及不同恶性程度浆液性腺癌

HER2 的表达水平, 也发现恶性程度越高的肿瘤组织 HER2 表达水平越高<sup>[17]</sup>。有学者猜想 kinesin family member 2A (KIF2A, 驱动蛋白 13 家族中的一员, 参与细胞的迁移和信号发送) 和 HER2 异常表达与卵巢上皮癌的侵袭行为有关, 这两种蛋白均可通过激活 PI3K/AKT (磷酸肌醇 3 激酶和蛋白激酶 B) 信号传递途径, 在细胞增殖、存活和侵袭等过程中发挥重要作用; 为确定 KIF2A 和 HER2 对于卵巢上皮癌的预后价值, Wang 等<sup>[18]</sup>用免疫组化对 111 例患者卵巢上皮癌组织和 48 例正常卵巢或输卵管组织的 KIF2A 和 HER2 蛋白表达水平进行了检测, 发现卵巢上皮癌组织细胞的 KIF2A 和 HER2 蛋白表达水平远高于正常卵巢或输卵管组织; 生存分析表明, 过表达 KIF2A 和 HER2 的卵巢癌患者总生存率明显低于 KIF2A<sup>-</sup>和(或)HER2<sup>-</sup>患者, 该研究还提示 KIF2A 和 HER2 蛋白表达情况与卵巢癌 FIGO (国际妇产科协会) 分期有关, 无论是单变量还是多变量分析均证实了 KIF2A 和 HER2 表达可作为卵巢上皮癌患者生存期的独立预测因素。

### 1.3 胃癌

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 我国 2010 年癌症登记中心的年度报告显示, 胃癌在我国恶性肿瘤中排名第 3, 其病死率居世界首位<sup>[19]</sup>。目前胃癌对放化疗敏感度不高, 再加上肿瘤浸润和远处转移严重影响患者的预后, 因此急需探索可用于临床诊断和预后评估的生物标志物, 以此作为胃癌诊断和治疗的靶点。HER2 作为细胞信号传导通路中的一个重要启动因子, 在癌细胞增殖、分化、转移过程中起重要作用, 因此 HER2 阳性的胃癌进展快、侵袭性强、容易恶化、预后不佳。国内外诸多研究报道了胃癌 HER2 阳性表达率存在巨大偏差, 介于 8.2%~53.4%, 一组 11 000 例胃癌样本的系统评价结果显示, HER2 阳性表达率为 18%, 且阳性患者总生存期相对较短<sup>[20]</sup>。全球多中心临床研究 ToGA 试验 (曲妥珠单抗联合化疗与单纯化疗治疗 HER2 阳性晚期胃或食管结合部位癌的 III 期、开放、随机对照临床试验) 报道 HER2 阳性表达率为 22.1%<sup>[21]</sup>。胃癌 HER2 阳性表达与多种因素密切相关, 但各文献报道的相关性并不完全一致。一项包含 5290 例胃癌病例的荟萃分析表明, HER2 过表达与胃癌分型 (包括 Borrmann 分型和 Lauren 分型)、肿瘤细胞分化程度、淋巴结和静脉浸润等因

素相关, 而与肿瘤大小、浸润深度和 TNM 分期无关<sup>[22]</sup>。还有研究发现, HER2 表达情况和年龄有关, 在小于 45 岁的胃癌患者中 HER2 蛋白过表达率仅为 3%, HER2 基因扩增率为 5%, 阳性表达率明显低于老年患者<sup>[23]</sup>。胃癌原发灶不同区域的 HER2 表达水平存在明显差异, 多区域同时取材将有助于全面而准确地评估 HER2 表达情况。

与 HER2 阳性乳腺癌不同, HER2 过表达或基因扩增可否作为胃癌独立预后因素尚存争议。有研究表明, HER2 阳性胃癌患者的预后较 HER2 阴性患者差<sup>[24]</sup>, 也有研究提示其二者预后无差异<sup>[25]</sup>。我国一项大规模多中心回顾性研究纳入了 1562 例胃癌患者, 探索 HER2 表达水平与经 R0 切除术 (胃切缘显微镜下未见癌细胞) 后胃癌患者预后之间的关系, 结果表明, 548 例患者 (35.08%) 为 HER2 阳性, 其阳性结果与无病生存率或总生存率无关, 提示 HER2 阳性水平不能作为胃癌患者生存预测的有效指标<sup>[26]</sup>。

### 1.4 胰腺癌

胰腺癌是居于世界前 4 位的高发恶性肿瘤, 在过去的 30 年中生存率无任何提高。国内外已有大量资料证实胰腺癌中亦存在 HER2 蛋白过表达和基因异常, 但其阳性率不高。为探讨胰腺癌组织中 HER2 基因表达状态及其在治疗与预后评估中的作用, 任新瑜等<sup>[27]</sup>对手术切除的 81 例胰腺导管癌及癌旁胰腺组织标本进行了 HER2 蛋白表达及基因状态变化的检测, 结果显示, 9 例患者癌组织 (11.1%) HER2 蛋白表达阳性, 15 例 (18.5%) HER2 基因扩增, HER2 基因扩增与淋巴结转移有显著相关性, 而癌旁胰腺组织未检测到 HER2 蛋白表达及基因扩增。一组 87 例胰腺导管腺癌样本研究表明, HER2 过表达只存在于小部分胰腺导管腺癌样本中, 且免疫染色具有明显异质性, 经免疫组织染色发现仅 9 例 HER2 阳性表达为 2+ 和 3+, 其中仅 6 例用双色银原位杂交检测到 HER2 基因扩增, 但未发现 HER2 表达与临床病理特征及生存率预测之间的关系<sup>[28]</sup>。HER2 的表达与胰腺癌的侵袭性相关, 在胰腺癌侵袭转移过程可能起重要作用。然而, HER2 表达与胰腺导管腺癌存活率的预测价值尚未明确, 已有研究提示 HER2 过表达不能作为胰腺癌的预后判断指标<sup>[29]</sup>。

### 1.5 前列腺癌

前列腺癌是一种严重影响老年男性健康和生命

的疾病,近年来其在我国的发病率明显上升。不少研究者采用荧光原位杂交(FISH)技术对前列腺癌中HER2基因扩增进行检测,其结果不一,在前列腺癌原发灶中HER2基因扩增率为0~53%<sup>[30]</sup>,用免疫组化分析HER2蛋白在前列腺癌中的阳性表达率为0%~100%<sup>[31]</sup>。Signoretti等<sup>[32]</sup>检测119例前列腺癌标本,其中67例仅行手术切除前列腺(UNT组),34例在行前列腺癌根治术前进行了抗雄激素治疗(TAA组),18例为雄激素非依赖性前列腺癌(AI组),结果显示,HER2蛋白在前列腺癌中存在过度表达(总阳性率为42.8%),尤其是经抗雄激素治疗者(20/34)及雄激素非依赖性的患者(14/18),提示HER2蛋白过表达可能对前列腺癌的发生及由激素依赖性发展为激素非依赖性的过程具有重要作用,进而可用于识别易于恶化进展及复发的前列腺癌患者。近年来有学者分析HER2可能参与前列腺癌细胞对放疗的抵抗作用,癌细胞膜上过表达的HER2蛋白对体外放疗的反应可导致癌细胞产生抗放射性<sup>[33]</sup>。

## 1.6 肺癌

肺癌是我国十大恶性肿瘤之一,其5年生存率很低。目前认为HER2基因是肺癌重要的癌基因之一,与肿瘤浸润和转移有关。有学者用免疫组化法检测了70例肺癌(43例鳞癌和27例腺癌)组织中HER2的表达,发现其在41.4%的患者中有过表达,并与肺癌淋巴结转移、TNM分期、患者术后生存率相关<sup>[34]</sup>,提示HER2是晚期肺癌生长的调控基因,干预HER2的过表达可能是治疗晚期肺癌的有效方法。对111例非小细胞肺癌样本(经穿刺活检或术中切除获得)的回顾性研究发现,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因突变率为10.81%,HER2阳性表达率为21.62%<sup>[35]</sup>,提示EGFR基因突变可阻断非小细胞肺癌病情进展,延长患者存活时间,而HER2过表达则预示着不良预后。有学者针对EGFR基因突变及HER2/HER3蛋白表达水平与吉非替尼治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC)疗效之间的关系进行了探索,结果表明,HER2高表达患者对吉非替尼治疗的有效率明显高于低表达患者,但未发现HER2/HER3的表达水平与疾病进展时间及总生存时间的相关性,但HER2/HER3高表达患者经吉非替尼治疗后的生存期较低表达患者略长(9.1个月 vs. 6.1

个月),且HER2和HER3同时高表达的患者这种现象更显著;EGFR基因突变伴随HER2高表达的患者对吉非替尼的反应较单一的HER2阳性患者更敏感;因此联合检测EGFR基因突变和HER2/HER3蛋白表达水平可更好预测吉非替尼对晚期非小细胞肺癌的疗效<sup>[36]</sup>。

## 2 HER2表达显像的分子探针及研究进展

近几年针对HER2配体的分子影像研究已取得进展,除免疫球蛋白曲妥珠单抗(trastuzumab)和帕妥珠单抗(pertuzumab)外,还包括免疫球蛋白片段(Fab')<sub>2</sub>、双链抗体(diabodies)、纳米抗体(nanobodies)、亲合体(affibody)以及人工设计的锚蛋白重复蛋白(ankyrin-repeat proteins)。在此基础上构建出用于SPECT、PET、MRI、超声及光学显像的靶向分子探针是当前HER2分子影像的研究热点。理想的HER2分子影像探针应具有快速的组织穿透能力,亲和力强,靶受体与分子探针具有较好的特异性识别能力,未结合的分子探针应能快速从血液循环中清除,靶与非靶比值高等优点。下面就几种不同的HER2表达分子探针及其进展做一介绍。

### 2.1 单克隆抗体

IgG分子对于靶抗原具有高亲和力,但它较长的生物半衰期限制了其在分子影像中的应用,因为在成像之前需要足够的血液清除率以达到最佳的肿瘤-血液分布比率;此外,IgG较大的相对分子量(150 000)也阻碍了它在肿瘤组织中的渗透过程。放射性标记的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗已被用于临床和临床前研究,如<sup>89</sup>Zr-trastuzumab、<sup>111</sup>In-DTPA-trastuzumab等。Dijkers等<sup>[37]</sup>用<sup>89</sup>Zr标记曲妥珠单抗构建分子探针<sup>89</sup>Zr-trastuzumab,并用于HER2的PET显像,结果发现,<sup>89</sup>Zr-trastuzumab可与HER2高表达细胞强效结合,低表达HER2的细胞则与之相反。此外,微型PET显像监测到经NVP-AUY922[一种热休克蛋白90(heart shock protein90, Hsp90)抑制剂]处理后<sup>89</sup>Zr-trastuzumab的摄取量下降了41%,即HER2分子水平出现了相应下调<sup>[38]</sup>,提示该方法有助于HER2阳性疾病治疗后的疗效评价及预后判断。

有研究者用<sup>111</sup>In标记曲妥珠单抗靶向探针进行小鼠移植瘤模型SPECT显像发现,高表达HER2的SKOV3细胞(人类卵巢癌细胞系)对标记探

针的摄取明显高于低表达 HER2 的 GLC4 细胞(人类小细胞肺癌细胞系),且 HER2 阳性转移灶的放射性摄取比原发灶高<sup>[39]</sup>。除 DTPA 外各种新型螯合剂也处于探索中,如 2,3-HOPQ(2,3-羟基吡啶酮,一种新型八齿双环螯合剂),用于 <sup>89</sup>Zr 与 trastuzumab 的标记效果较好<sup>[40]</sup>。

## 2.2 抗体片段

抗体片段 R(ab')<sub>2</sub> 作为配体的优点是分子质量小,其更短的半衰期有利于快速成像,且行两次显像的时间间隔更短。Smith-Jones 等<sup>[41]</sup>研究发现,经 Hsp90 抑制剂处理 24 h 后 HER2 阳性病灶对 <sup>68</sup>Ga-DOTA-R(ab')<sub>2</sub>-trastuzumab 的摄取减少,即肿瘤细胞 HER2 表达水平有所下降。此外,用 Hsp90 抑制剂对 HER2 高表达移植瘤处理后,<sup>68</sup>Ga-DOTA-R(ab')<sub>2</sub>-trastuzumab PET 显像对 HER2 减量调节检测的灵敏度明显高于 <sup>18</sup>F-FDG PET<sup>[42]</sup>。

为了提高 Fab 片段在组织中的分散程度及肿瘤细胞的摄取率,Dennis 等<sup>[43]</sup>对一种双功能分子 AB.Fab4D5(能够同时与 HER2 和白蛋白相结合)进行 SPECT/CT 显像发现,静脉注射 <sup>111</sup>In-AB.Fab4D5 后 48 h 内在 HER2 高表达移植瘤中的摄取率高于 <sup>111</sup>In-Fab4D5 和 <sup>111</sup>In-trastuzumab;此外,AB.Fab4D5 由于白蛋白的关系使其经肾脏分泌减少,以至于在体内存留的时间延长,有利于其在组织内充分分布、扩散以提高肿瘤的摄取率。

## 2.3 亲合体

亲合体分子是一类由 58 个氨基酸残基组成、分子质量仅为 7000 的非免疫球蛋白亲和配体,其功能类似于抗体却又有着一些抗体所不具备的性质,如相对分子质量小、折叠速率快、选择性和亲和力高,以及结构稳定、可耐受化学修饰等。

亲合体分子 Z(HER2:342)能够特异性结合 HER2,且不受放射性核素标记和曲妥珠单抗的影响<sup>[44]</sup>,<sup>18</sup>F-FBEM-Z(HER2:342)可用于检测 HER2 表达水平及其在 Hsp90 抑制剂处理后 HER2 下调的改变 FBEM<sup>①</sup>,且在 HER2 阳性瘤灶内能快速积累,并于 20 min 后达较高的肿瘤/血液和肿瘤/肌肉分布比值。因此,<sup>18</sup>F 标记的亲合体分子将有望用于治疗期间 HER2 表达变化的监测<sup>[45]</sup>。Ahlgren 等<sup>[46]</sup>发现,<sup>99</sup>Tc<sup>m</sup>-Z(HER2:342)-C<sup>②</sup>经注射后能够在 HER2 高表达组织中快速聚集,且肝脏的摄取量明显低于肿瘤组织,靶与非靶比值高。Orlova 等<sup>[47]</sup>发

现,<sup>124</sup>I-PIB-Z(HER2:342)也表现出相似的特性,亲合体分子能在血流中被快速清除,其肿瘤/非肿瘤组织(血液、肝、肺)比值高 PIB<sup>③</sup>。

Sörensen 等<sup>[48]</sup>首次在人体利用基于亲合体分子 <sup>111</sup>In-ABY-025<sup>④</sup>的 HER2 分子影像,监测乳腺癌转移灶 HER2 表达水平,结果显示,注射 <sup>111</sup>In-ABY-025 后,血液清除速率快,4~24 h 时可获得高对比度的 HER2 分子影像,且与 HER2 的结合不受 HER2 靶向药物治疗的影响,患者受到的辐射有效剂量为 0.15 mSv/MBq,安全可耐受;在 HER2 阳性的转移灶内,肿瘤/血液放射性比值高,而 HER2 阴性转移瘤正好相反;因此,<sup>111</sup>In-ABY-025 可安全用于人体显像,无创性定位 HER2 阳性转移灶。在后续研究中还发现,<sup>68</sup>Ga-ABY-025 PET/CT 可精确定量转移性乳腺癌患者全身的 HER2 表达水平<sup>[49]</sup>。

早期有学者发现,在亲合体分子的 N 端连接一个带负电荷的纯化标签可减少其在肝脏的摄取,因此,Westerlund 等<sup>[50]</sup>设想在亲合体分子的 N 端连接一个螯合剂也能达到相同效果,为验证此设想,他们将 DOTA<sup>⑤</sup>和 DOTAGA(DOTA 的衍生物,GA 为谷氨酸)两种螯合剂通过酰胺键人工结合到 Z(HER2:2891)的 N 端,并用 <sup>111</sup>In 和 <sup>68</sup>Ga 进行标记,结果发现,<sup>111</sup>In-DOTAGA-Z(HER2:2891)和 <sup>68</sup>Ga-DOTAGA-Z(HER2:2891)在肝脏和血液中均摄取较少,放射性也较弱,且前者的血液清除速率较后者更快;另外,与 DOTA 相比,DOTAGA 复合物的肿瘤/血液和肿瘤/肝脏比值更高。蔡炯等<sup>[51]</sup>通过基因工程制备含末端半胱氨酸的 HER2 亲合体,以 DOTA 为螯合剂用 <sup>68</sup>Ga 标记,用于 HER2 表达的乳腺癌细胞体外结合实验和体内 microPET 显像,并显示出良好的生物学性能。

Honarvar 等<sup>[52]</sup>为减少亲合体分子在肾内的重吸收,设计出亲合体-PNA(肽核酸)嵌合体 Z(HER2:342)-SR-HP1[由一种重组表达的亲合体分子 Z(HER2:

①FBEM: N-[2-(4-<sup>18</sup>F-氟苯甲酰氨基)乙基马来酰亚胺]; N-[2-(4-<sup>18</sup>F-fluorobenzamido)ethyl]maleimide

②C: 半胱氨酸; cysteine

③PIB: 对碘代苯甲酸乙酯; p-iodobenzoate

④ABY-025: Z(HER2:2891),第二代合成的抗 HER2 的亲合体分子

⑤DOTA: 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四羧酸; 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid

342)-SR-H6 和杂交探针 [ hybridization probes, HP1) 共价结合构成]及与之互补的 HP2 杂交探针( 可用  $^{125}\text{I}$  和  $^{111}\text{In}$  标记), 并用于 HER2 阳性的卵巢癌细胞系 SKOV-3 移植瘤寻靶实验, 结果发现, 提前注射 ZHER2:342-SR-HP1 4 h 后 PNA 互补探针  $^{111}\text{In}/^{125}\text{I}$ -HP2 高度浓聚于移植瘤灶内[1 h 时的摄取率达  $19\pm 2$ ) %ID/g], 且在血液和肾脏内的吸收明显减少, 因此, 应用基于亲合体-PNA 介导的预定位技术能特异性地将放射性核素输送至肿瘤组织, 提高了肿瘤组织的放射性浓度, 减少了血液和肾内的放射性本底。Strand 等<sup>[53]</sup>发现 IPEM 4-iodophenethylmaleimide, 4-碘化苯乙基马来酰亚胺) 凭借其较强的亲脂性和对放射性的代谢能力, 也能减少肾内的放射性聚集, 从而改善肿瘤成像的对比度。

## 2.4 双链抗体

双链抗体是由单链抗体 (scFv) 通过非共价键构成的二聚体。C6.5 双链抗体 (C6.5db) 可特异性结合靶受体 HER2, 其相对分子质量小( 52 000)、半衰期短, 因而首次通过肾脏时即被清除。它可产自于毕赤酵母 *Pichia pastoris*( P-C6.5db) 或是大肠杆菌 *Escherichia coli*( E-C6.5db)<sup>[54]</sup>, 用于 HER2 分子影像探针的有  $^{124}\text{I}$ -E-C6.5db、 $^{125}\text{I}$ -E-C6.5db。

有研究发现,  $^{124}\text{I}$ -E-C6.5db 在注射后 4 h 就能识别 HER2 阳性的 SKOV3 细胞, 且在 24 h 和 48 h 时肿瘤/血液分布比高达 6.7 和 13.5, 而在 HER2 阴性的 MDA-MB-468 肿瘤组织中的分布与血液无明显差异, 表明该显像剂可用于评价 HER2 的水平, 并作为针对 HER2 治疗反应的预测剂<sup>[55]</sup>。另一项研究发现, 在体外帕妥珠单抗和 C6.5db 竞争性结合 HER2, 而曲妥珠单抗和 C6.5db 与 HER2 几乎同时结合, 肿瘤摄取  $^{125}\text{I}$ -E-C6.5db 的量随着曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的存在而减少, 因此它在靶向治疗期间进行 HER2 水平监测的临床应用方面将会受到限制<sup>[56]</sup>。

## 2.5 人工设计的锚蛋白重复蛋白 (designed ankyrin repeat proteins, DARPins)

DARPins 由演变保守的天然锚蛋白重复蛋白构成, 它也存在人类基因组表达的众多结合蛋白中。有研究发现, DARPins 贯穿于细胞内, 结合在细胞膜上, 还可以被分泌, 它们通过结合各种不同的靶蛋白参与调节蛋白质之间的相互作用, 从而实现多种生理功能; 每一次锚蛋白重复都贡献出了一

个靶向结合位点, 以致能与靶分子高度亲和; 此外, 锚蛋白重复形成的支架结构具有高度通用性, 可通过对其重复结构进行复制、剪切或重排来选择性改变其特异性结合的对象<sup>[57]</sup>。

Zahnd 等<sup>[58]</sup>发现, 注射  $^{99\text{Tc}^{\text{m}}}$ -G3 DARPins( G3: Gly3, glycine) 后 1 h 和 24 h 瘤灶内的分布分别为 (  $9.12\pm 1.77$ ) %ID/g 和 (  $6.46\pm 0.96$ ) %ID/g, 由于血流对 G3 DARPins 快速清除导致在 1 h 后肿瘤/血液比值高达  $12.67\pm 3.34$ , 且在 48 h 后升至  $71.78\pm 26.62$ ; G3 DARPins 在整个肿瘤组织中的渗透速度相当快, 同时肿瘤边缘仅有轻微浓聚, 使得显像更加清晰。然而肿瘤/肝脏摄取比值在 48 h 后仍小于 2, 因此 G3 DARPins 不利于分辨肝脏内 HER2 阳性转移瘤。

G3 DARPins 可与六聚组氨酸 (hexahistidine, His6) 或谷氨酰组氨酸 [histidine glutamate, ( HE) 3] 结合形成 His6-G3 和 ( HE) 3-G3。有研究发现, 无论是用  $^{125}\text{I}$  还是  $^{111}\text{In}$  标记, ( HE) 3-G3 在肝脏的摄取率明显低于 His6-G3; 注射显像剂 4 h 后  $^{125}\text{I}$ ( HE) 3-G3 和  $^{111}\text{In}$ ( HE) 3-G3 均可在 HER2 阳性病灶处显像, 但相较  $^{125}\text{I}$ ( HE) 3-G3 24 h 肿瘤/血液摄取比值为  $22.0\pm 11.3$ ) 而言,  $^{111}\text{In}$ ( HE) 3-G3 在肿瘤组织中扩散更充分且从血清中清除更迅速, 24 h 肿瘤/血液比值高达  $343.7\pm 161.3$ , 因此更有利于形成清晰图像<sup>[59]</sup>。

Mironova 等<sup>[60]</sup>用红色荧光蛋白 mCherry 标记 DARPins9-29 构建出 HER2 高特异性的杂交探针 DARPins-mCherry, 并通过免疫荧光分析证实了其可用于 HER2 过表达细胞的荧光可视化, 从而使 HER2 阳性病灶清晰显像。

## 2.6 纳米抗体

1993 年, 比利时科学家 Hamers-casterman 等<sup>[61]</sup>首次在 Nature 报道, 骆驼血液中的抗体有一半没有轻链, 且这些缺失轻链的重链抗体 (heavy-chain antibodies, HCAbs) 能像正常抗体一样与抗原等靶标紧密结合, 另外不像单链抗体 (scFv) 那样互相黏连甚至聚集成块。这种抗体只包含一个重链可变区 (variable domain of heavy chain of HCAb, VHH) 和两个常规的 CH2 和 CH3 区, 更重要的是单克隆出的 VHH 区具有很好的结构稳定性和抗原结合活性, 是目前已知的可结合靶抗原的最小单位。

抗 HER2 的纳米抗体 2Rs15d 可特异性结合

HER2, 且不受曲妥珠单抗治疗的影响。有研究发现,  $^{99m}\text{Tc}$ -2Rs15d 因其血流清除速率快而很少在血液、肝脏等非肿瘤组织中被摄取[经注射 1.5 h 后血液和肝脏放射性浓聚分别为  $(0.26\pm 0.03)\% \text{ID/g}$  和  $(0.72\pm 0.14)\% \text{ID/g}$ ], 而在 HER2 阳性肿瘤组织中高度浓聚[  $4.19\pm 0.47)\% \text{ID/g}$ ], 有利于对比成像<sup>[62]</sup>。另外, 有研究发现, 基于双功能螯合剂(1B4M-DTPA)用  $^{177}\text{Lu}$  标记 2Rs15d 形成的复合物  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-2Rs15d, 静脉注射后 24 h 肿瘤/血液比高达  $1264.08\pm 53.108$ , 这种高对比度有利于 HER2 阳性肿瘤组织清晰显影, 而 HER2 阴性移植瘤的摄取基本可以忽略; 同时它的特异性寻靶能力有助于药物聚集于 HER2 阳性肿瘤进行放射免疫治疗<sup>[63]</sup>。

Xavier 等<sup>[64]</sup>对  $^{18}\text{F}$ -纳米抗体 PET 显影用于 HER2 阳性肿瘤的诊断与探查进行了研究, 研究表明,  $^{18}\text{F}$ -纳米抗体高度浓聚于 HER2 阳性移植瘤, 而在非肿瘤组织中分布率较低, 靶与非靶比值高, 且  $^{18}\text{F}$ -纳米抗体识别 HER2 蛋白不受治疗过程中曲妥珠单抗的影响, 因此可用于正在进行曲妥珠单抗靶向治疗的患者全身 HER2 分子水平变化的监测。Vaidyanathan 等<sup>[65]</sup>也发现,  $^{18}\text{F}$ -RL-I-5F7 纳米抗体分子探针有良好的肿瘤/血液比值, 在评估 HER2 分子水平方面具有极佳优势。然而, 较多的显像剂聚集于肾脏是影响本底的重要问题, 如何减少肾脏的摄取还有待进一步研究。

Massa 等<sup>[66]</sup>发现转氨酶 A 介导的纳米抗体多功能定点标记可用于多模态分子显像, 即经转氨酶 A 介导, 纳米抗体分子可分别结合 3 种不同的探针, 即用于 SPECT 显像的  $^{111}\text{In}$ -DTPA/NOTA (NOTA: 1, 4, 7-triazacyclononane-1, 4, 7-triacetic acid, 1, 4, 7-三氮杂环十二烷-1, 4, 7-三羧酸); 用于 PET 显像的  $^{68}\text{Ga}$ -DTPA/NOTA 和用于荧光反射显像 (FRI) 的荧光染料 Cy5。这种酶结合并不影响纳米抗体对 HER2 的亲合性, 也不影响其放射标记的有效性和光谱特性。该实验结果表明, 3 种显像模式中的示踪剂均能够在 HER2 过表达的 BT474M1-肿瘤灶内高度浓聚, 且具有良好的靶与非靶比值和快速成像等优势。

## 2.7 磁共振 magnetic resonance, MR) 分子探针

MR 分子成像技术是以靶向性配体为载体, 通过其与靶分子特异性结合, 将探针导向靶标, 利用高场强的 MR 成像技术探测体内靶分子的分布情

况, 实现靶分子的定位显像。使用 MR 分子成像技术对肿瘤组织进行标记、显像是目前分子影像的研究热点之一。设计适宜的分子探针可增加 MR 成像的灵敏度。MR 靶向分子探针主要由靶向性配体、转运体及其携带的对比剂组成, 目前常用的 MR 对比剂有以钆 (gadolinium, Gd) 为代表的顺磁性分子探针, 能产生 T1 阳性信号对比, 代表性产物有 Gd-DTPA 和 Gd-DOTA; 以及以氧化铁为代表的超顺磁性分子探针, 如氧化铁纳米粒 (iron oxide nanoparticles, IONPs)。

有研究者将 HER2 特异性荧光标记分子 FITC-LTVSPWY (七肽分子, 由苏州特瑞药业有限公司负责合成) 与 Gd-DTPA 耦联获得 MR 靶向分子探针 FITC-LTVSPWY-Gd-DTPA, 以 HER2 阳性的人乳腺癌细胞 SKBR3、MCF-7 及 HER2 阴性细胞 MDA-MB-231 为观察对象, 结果发现, FITC-LTVSPWY-Gd-DTPA 组 T1 加权成像呈高信号, Gd-DTPA 组及空白对照组均呈等信号, 且存在视觉差异; FITC-LTVSPWY-Gd-DTPA 具有良好的磁特性, 且 HER2 靶向性强, 可为 HER2 阳性癌症患者个体化治疗提供影像学依据<sup>[67]</sup>。也可以将 IONPs 耦联单链抗体构建靶向 HER2 的 MR 分子探针 scFv-IONPs 作为 HER2 阳性肿瘤 MR 分子显像的特异性对比剂<sup>[68]</sup>。

## 2.8 超声分子探针

随着超声分子探针技术的兴起, 超声分子影像已成为当前医学影像学研究的热点之一。其原理是将特异性配体结合到直径小于红细胞的超声造影剂表面, 经血循环运输并穿透血管壁聚集于靶组织, 从分子或细胞水平获得病变组织的生化及病理改变。分子探针——微泡造影剂的设计是超声分子影像研究的重点。目前用于超声分子影像的第四代纳米级超声微泡造影剂有磷脂微泡造影剂、纳米级微泡造影剂和液态氟碳纳米粒, 其特点是能够穿过血管内皮细胞进入组织间隙, 实现血管外聚集成像, 对血管外组织病变进行靶向诊断和靶向载药治疗; 且能在体内稳定存在较长时间, 便于延迟显像或重复检查。也有采用单乳化法制备包裹了液态氟碳 (PFH) 的高分子 PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid), 聚乳酸-羟基乙酸共聚物] 纳米球 (PFH-PLGA), 通过碳二亚胺法将曲妥珠单抗 (trastuzumab) 连接到纳米球表面, 制成 HER2 靶向纳米球 (PFH-PLGA-trastuzumab), 用于 HER2 阳性乳腺癌显像。

Yang 等<sup>[69]</sup>通过运用薄膜水合法控制磷脂膜的厚度研制出统一大小的纳米微泡 (nanobubbles, NBs), 并将其与亲合体分子结合获得纳米级超声造影剂 NBs-affibody, 实验结果发现, NBs-affibody 对 HER2 阳性肿瘤具有高度亲和性, 且呈现出明显的超声强化[峰值强度达  $104.5 \pm 2.1$  dB]。该研究表明, NBs-affibody 作为一种新型 HER2 靶向超声造影剂, 能够进行安全而有效的分子显像, 有望用于早期癌症生物标志物 (HER2) 的定量诊断及靶向治疗。

## 2.9 光学分子探针

光学分子成像技术是一种通过荧光标记的分子探针与靶标结合发出信号, 经光学影像设备检测和计算机处理最终获得病变组织的分子信息, 实现肿瘤早期非侵入性检测、诊断, 指导个体化治疗。设计具有靶向性强、亲和力高的分子探针是光学分子成像的基础。光学分子探针是由荧光团、识别基团和连接臂组成, 目前主要分为有机荧光探针和无机纳米材料探针<sup>[70]</sup>。传统的有机染料存在光谱较窄、光稳定性较差、荧光寿命较短等缺点, 而新型无机纳米材料的荧光强度、光稳定性与之相比明显增强。

量子点 (quantum dots, QDs) 是一种半导体纳米粒, 近年引起国内外学者的关注, 其检测肿瘤的灵敏度较传统荧光蛋白明显提高。Ag 等<sup>[71]</sup>将抗 HER2 抗体共价连接在修饰的巯基乙酸量子点 (TGA-QDs) 上构建分子探针, 以过表达 HER2 的 A549 肺癌细胞作为寻靶实验对象, 以低表达 HER2 的 NIH-3T3 细胞作为对照, 荧光显微成像结果显示, TGA-QDs/anti-HER2 检测到的荧光信号明显较对照组强; 进一步研究发现, TGA-QDs/anti-HER2 可在特异性识别受体后被细胞摄取, 进入胞质的囊泡结构, 通过荧光显像实现对活细胞的标记和定位。Rakovich 等<sup>[72]</sup>将基于 QDs 的纳米探针结合抗 HER2 抗体单域 (sdAbs) 所构成的复合物 sdAbs-QDs 用于乳腺癌和肺癌细胞的免疫标记, 将其成像表现与 HER2 单克隆抗体结合传统有机染料 Alexa Fluor 488 (一种常用的非常明亮的绿色荧光探针) 或 Alexa Fluor 568 所构成的探针进行比较, 结果发现, sdAbs-QD 染色更鲜明, 使得肺癌病灶轮廓更清晰, 且能区分 HER2 差异性表达; sdAbs-QD 有助于确认和定位癌症早期的生物标志物, 为早期癌症的检测提供灵敏方法。

另有研究者发现硅量子点 (silicon quantum dots, SiQDs) 具有无毒、抗光漂白以及能够被生物分解的特性, 用牛血清白蛋白 (BSA) 和高分子聚乙二醇 (PEG) 组成的防污涂料, 对 SiQD-NP (NPs: nanoparticles, 纳米粒) 结合 anti-HER2 形成的复合物进行包裹, 所构成的分子探针可用于肝癌细胞的免疫染色, 研究结果表明, SiQD-NPs/anti-HER2 可高特异性识别 HER2 阳性的 SKOV3 细胞并使其被荧光染色, 而与 HER2 阴性的 CHO 细胞的结合可忽略不计<sup>[73]</sup>。Michalska 等<sup>[74]</sup>在对 QDs 的研究中用两亲性大分子——聚马来酸酐十八醇酯 (PMAO) 包裹合金 CuInZnS<sub>2+x</sub>QD (ZCIS QDs) 以增加它的水溶性, 并将这些纳米晶体用于 HER2 阳性细胞的靶向定位, 结果表明, 该 QDs 可安全、有效地选择性标记 SKBR3 癌细胞 (HER2 阳性)。国内有研究者将小蛋白亲合体分子稳定结合在 QDs 上获得荧光分子探针 AF-QDs, 并用于人 A549 肺癌细胞表面 HER2 蛋白的荧光显像<sup>[75]</sup>, 这种一步合成法不仅避免了复杂的化学结合过程, 且能有效地与肿瘤细胞表面的 HER2 分子特异性结合。

## 3 小结

HER2 是一种高表达于多种癌细胞的肿瘤标志物, 尤其是在乳腺癌和非小细胞肺癌。HER2 表达分子显像为临床对癌灶的定位诊断、靶向治疗和预后评估提供了有利条件。目前处于研究阶段的各种靶向分子均有潜在应用价值, 但也各有利弊。完整抗体和 Fab' 2 片段虽能特异性结合 HER2, 但对 HER2 阳性病变的检出尚缺乏敏感性; 而亲和体和纳米抗体等非免疫球蛋白的小分子配体因其分子质量小, 可在肿瘤组织中充分扩散, 在非肿瘤组织中摄取较少等优势在 HER2 分子影像发展中具有潜在价值。用于 HER2 分子影像的 PET、SPECT、MR、超声及光学分子探针的构建均建立在 HER2 靶向配体的基础上, 这些分子探针对于 HER2 具有高亲和力, 其发射出的各种信号能被探测仪器在体外检测到, 对 HER2 阳性病变的无创性诊断、预后与辅助治疗具有重要临床价值。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展, 不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 汪文霞负责文献综述撰写; 兰晓莉负责内容审核; 张永学负责文章立题和修改。



## 参 考 文 献

- [ 1 ] Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185, 000-Mr tumour antigen[J]. *Nature*, 1984, 312(5994): 513-516.
- [ 2 ] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30. DOI: 10.3322/caac.21166.
- [ 3 ] 刘芳, 唐光才. 乳腺癌影像诊断的研究现状[J]. *国际医学放射学杂志*, 2013, 36(6): 533-537. DOI: 10.3874/j.issn.1674-1897.2013.06.Z0605.
- Liu F, Tang GC. The current status of imaging diagnosis of breast cancer[J]. *Int J Med Radiol*, 2013, 36(6): 533-537.
- [ 4 ] King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma[J]. *Science*, 1985, 229(4717): 974-976. DOI: 10.1126/science.2992089.
- [ 5 ] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene[J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-182. DOI: 10.1126/science.3798106.
- [ 6 ] Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine[J]. *Oncologist*, 2009, 14(4): 320-368. DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0230.
- [ 7 ] Fu W, Loboeki CA, Silberberg BK, et al. Molecular markers in Paget disease of the breast[J]. *J Surg Oncol*, 2001, 77(3): 171-178. DOI: 10.1002/jso.1090.
- [ 8 ] Debska-Szmich S, Krakowska M, Czernek U, et al. The role of preoperative systemic treatment in patients with breast cancer[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2016, 20(2): 93-101. DOI: 10.5114/wo.2016.60067.
- [ 9 ] Zhang B, Cai FF, Zhong XY. An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 158(2): 119-123. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2011.04.023.
- [ 10 ] Corney DC, Hwang CL, Matoso A, et al. Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4): 1119-1128. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2642.
- [ 11 ] Verri E, Guglielmini P, Puntoni M, et al. HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: evaluation of its prevalence and prognostic significance. Clinical study[J]. *Oncology*, 2005, 68(2/3): 154-161. DOI: 10.1159/000086958.
- [ 12 ] Tanabe H, Nishii H, Sakata A, et al. Overexpression of HER-2/neu is not a risk factor in ovarian clear cell adenocarcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(3): 735-739. DOI: 10.1016/j.ygyno.2004.05.055.
- [ 13 ] Mano MS, Awada A, Di LA, et al. Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(3): 887-895. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.12.010.
- [ 14 ] Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, et al. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(2): 283-290. DOI: 10.1200/JCO.2003.10.104.
- [ 15 ] Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, et al. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients[J/OL]. *PLoS One*, 2007, 2(11): 1138[2016-08-03]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001138>. DOI: 10.1371/journal.pone.0001138.
- [ 16 ] Suo Z, Karbovo E, Karbove K, et al. Papillary serous carcinoma of the ovary: an ultrastructural and immunohistochemical study[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2004, 28(3): 141-147. DOI: 10.1080/01913120490475716.
- [ 17 ] O'Neill CJ, Deavers MT, Malpica A, et al. An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms[J]. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(8): 1034-1041.
- [ 18 ] Wang D, Zhu H, Ye Q, et al. Prognostic Value of KIF2A and HER2-Neu Overexpression in Patients with Epithelial Ovarian Cancer[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(8): 2803[2016-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4779007/>. DOI: 10.1097/MD.0000000000002803.
- [ 19 ] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010[J]. *Chin J Cancer Res*, 2014, 26(1): 48-58. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2014.01.08.
- [ 20 ] Abrahão-Machado LF, Jácome AA, Wohnrath DR, et al. HER2 in gastric cancer: comparative analysis of three different antibodies using whole-tissue sections and tissue microarrays[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(38): 6438-6446. DOI: 10.3748/wjg.v19.i38.6438.
- [ 21 ] Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2010, 376(9742): 687-697. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- [ 22 ] Liang JW, Zhang JJ, Zhang T, et al. Clinicopathological and prognostic significance of HER2 overexpression in gastric cancer: a meta-analysis of the literature[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4849-4858. DOI: 10.1007/s13277-014-1636-3.
- [ 23 ] Moelans CB, Milne AN, Morsink FH, et al. Low frequency of HER2 amplification and overexpression in early onset gastric cancer[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011, 34(2): 89-95. DOI: 10.1007/s13402-011-0021-0.
- [ 24 ] Chen C, Yang JM, Hu TT, et al. Prognostic role of human epidermal growth factor receptor in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(5): 380-389. DOI: 10.1016/j.arcmed.2013.07.001.
- [ 25 ] Fisher SB, Fisher KE, Squires MH 3rd, et al. HER2 in resected gastric cancer: Is there prognostic value? [J]. *J Surg Oncol*, 2014, 109(2): 61-66. DOI: 10.1002/jso.23456.
- [ 26 ] Shen GS, Zhao JD, Zhao JH, et al. Association of HER2 status with prognosis in gastric cancer patients undergoing R0 resection: A large-scale multicenter study in China[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(23): 5406-5414. DOI: 10.3748/wjg.v22.i23.5406.

- [ 27 ] 任新瑜, 尹玉峰, 高洁, 等. 中国人群胰腺癌与胃癌 HER2/neu 基因表达[J]. 协和医学杂志, 2012, 3(1): 21–25. DOI: 10.3969/j.issn.1674–9081.2012.01.006.
- Ren XY, Yin YF, Gao J, et al. Detection of HER2/neu Gene in Pancreatic and Gastric Adenocarcinoma among Chinese Patients[J]. Med J Peking Union Med Coll Hosp, 2012, 3(1): 21–25.
- [ 28 ] Aumayr K, Soleiman A, Sahara K, et al. HER2 gene amplification and protein expression in pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2014, 22(2): 146–152. DOI: 10.1097/PAL.0b013e31828dc392.
- [ 29 ] Ata A, Polat A, Serinsöz E, et al. Prognostic value of increased HER2 expression in cancers of pancreas and biliary tree[J]. Pathol Oncol Res, 2015, 21(3): 831–838. DOI: 10.1007/s12253–014–9847–x.
- [ 30 ] Liu HL, Gandour-Edwards R, Lara PN, et al. Detection of low level HER-2/neu gene amplification in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization[J]. Cancer J, 2001, 7(5): 395–403.
- [ 31 ] Ross JS, Sheehan CE, Hayner-Buchan AM, et al. Prognostic significance of HER-2/neu gene amplification status by fluorescence in situ hybridization of prostate carcinoma[J]. Cancer, 1997, 79(11): 2162–2170. DOI: 10.1002/(SICI)1097–0142(19970601)79:11<2162:AID-CNCR14>3.0.CO;2-U.
- [ 32 ] Signoretto S, Montironi R, Manola J, et al. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(23): 1918–1925. DOI: 10.1093/jnci/92.23.1918.
- [ 33 ] Andersson J, Rosestedt M, Orlova A. Imaging of HER2 may improve the outcome of external irradiation therapy for prostate cancer patients[J]. Oncol Lett, 2015, 9(2): 950–954. DOI: 10.3892/ol.2014.2760.
- [ 34 ] 邓在春, 俞文英, 胡国平, 等. erbB1/HER1 和 erbB2/HER2 在肺癌的表达[J]. 现代实用医学, 2001, 13(11): 539–541. DOI: 10.3969/j.issn.1671–0800.2001.11.003.
- Deng ZC, Yu WY, Hu GP, et al. Expression of erbB1/HER1 and erbB2/HER2 in lung cancer[J]. Modern Pract Med, 2001, 13(11): 539–541.
- [ 35 ] Shen H, Du G, Liu Z, et al. Assessment and prognostic analysis of EGFR mutations or/and HER2 overexpression in Uygur's Non-small Cell Lung Cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(12): 22300–22309.
- [ 36 ] Han Y, Xu JM, Duan HQ, et al. Correlation of epidermal growth factor receptor mutations and HER2/3 protein expression with clinical outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(1): 69–75.
- [ 37 ] Dijkers EC, Kosterink JG, Rademaker AP, et al. Development and characterization of clinical-grade  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging[J]. J Nucl Med, 2009, 50(6): 974–981. DOI: 10.2967/jnumed.108.060392.
- [ 38 ] Oude Munnink TH, Korte MA, Nagengast WB, et al.  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab PET visualises HER2 downregulation by the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in a human tumour xenograft[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(3): 678–684. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.12.009.
- [ 39 ] Lub-de Hooge MN, Kosterink JG, Perik PJ, et al. Preclinical characterisation of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab[J]. Br J Pharmacol, 2004, 143(1): 99–106. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705915.
- [ 40 ] N Timianow J, Pandya DN, Pailloux SL, et al. Evaluation of a 3-hydroxypyridin-2-one (2, 3-HOPO) Based Macrocyclic Chelator for  $^{89}\text{Zr}$  (4+) and Its Use for ImmunoPET Imaging of HER2 Positive Model of Ovarian Carcinoma in Mice[J]. Theranostics, 2016, 6(4): 511–521. DOI: 10.7150/thno.14261.
- [ 41 ] Smith-Jones PM, Solit DB, Akhurst T, et al. Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(6): 701–706. DOI: 10.1038/nbt968.
- [ 42 ] Smith-Jones PM, Solit D, Afroze F, et al. Early tumor response to Hsp90 therapy using HER2 PET; comparison with  $^{18}\text{F}$ -FDG PET[J]. J Nucl Med, 2006, 47(5): 793–796.
- [ 43 ] Dennis MS, Jin H, Dugger D, et al. Imaging tumors with an albumin-binding Fab, a novel tumor-targeting agent[J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 54–261. DOI: 10.1158/0008–5472.CAN–06–2531.
- [ 44 ] Orlova A, Tolmachev V, Pehrson R, et al. Synthetic affibody molecules: a novel class of affinity ligands for molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 2178–2186. DOI: 10.1158/0008–5472.CAN–06–2887.
- [ 45 ] Kramer-Marek G, Kieseewetter DO, Capala J. Changes in HER2 expression in breast cancer xenografts after therapy can be quantified using PET and  $^{18}\text{F}$ -labeled affibody molecules[J]. J Nucl Med, 2009, 50(7): 1131–1139. DOI: 10.2967/jnumed.108.057695.
- [ 46 ] Ahlgren S, Wällberg H, Tran TA, et al. Targeting of HER2-expressing tumors with a site-specifically  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled recombinant affibody molecule, ZHER2;2395, with C-terminally engineered cysteine[J]. J Nucl Med, 2009, 50(5): 781–789. DOI: 10.2967/jnumed.108.056929.
- [ 47 ] Orlova A, Wällberg H, Stone-Elander S, et al. On the selection of a tracer for PET imaging of HER2-expressing tumors; direct comparison of a  $^{124}\text{I}$ -labeled affibody molecule and trastuzumab in a murine xenograft model[J]. J Nucl Med, 2009, 50(3): 417–425. DOI: 10.2967/jnumed.108.057919.
- [ 48 ] Sörensen J, Sandberg D, Sandström M, et al. First-in-human molecular imaging of HER2 expression in breast cancer metastases using the  $^{111}\text{In}$ -ABY-025 affibody molecule[J]. J Nucl Med, 2014, 55(5): 730–735. DOI: 10.2967/jnumed.113.131243.
- [ 49 ] Sörensen J, Veliky I, Sandberg D, et al. Measuring HER2-receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using [ $^{68}\text{Ga}$ ]ABY-025 Affibody PET/CT[J]. Theranostics, 2016, 6(2): 262–271. DOI: 10.7150/thno.13502.
- [ 50 ] Westerlund K, Honarvar H, Norrström E, et al. Increasing the Net Negative Charge by Replacement of DOTA Chelator with DOTAGA Improves the Biodistribution of Radiolabeled Second-Generation Synthetic Affibody Molecules[J]. Mol Pharm, 2016, 13(5): 1668–1678. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00089.
- [ 51 ] 蔡炯, 党永红, 郑堃, 等. 含末端半胱氨酸人表皮生长因子受体 2 亲和体的  $^{68}\text{Ga}$  标记和显像[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(6): 460–463. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–2848.2013.06.014.

- Cai J, Dang YH, Zheng K, et al.  $^{68}\text{Ga}$ -labeled HER2 affibody with C-terminal cysteine and its PET imaging[J]. *Chin J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 33(6): 460-463.
- [ 52] Honarvar H, Westerlund K, Altai M, et al. Feasibility of Affibody Molecule-Based PNA-Mediated Radionuclide Pretargeting of Malignant Tumors[J]. *Theranostics*, 2016, 6(1): 93-103. DOI:10.7150/thno.12766.
- [ 53] Strand J, Nordeman P, Honarvar H, et al. Site-Specific Radioiodination of HER2-Targeting Affibody Molecules using 4-Iodophenethyl-maleimide Decreases Renal Uptake of radioactivity[J]. *Chemistry-Open*, 2015, 4(2): 174-182. DOI:10.1002/open.201402097.
- [ 54] Miller J, Doss M, McQuillen R, et al. Impact of expression system on the function of the C6.5 diabody PET radiotracer[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(3): 617-627. DOI:10.1007/s13277-012-0361-z.
- [ 55] Robinson MK, Doss M, Shaller C, et al. Quantitative immunopositron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1471-1478. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-2008.
- [ 56] Reddy S, Shaller CC, Doss M, et al. Evaluation of the anti-HER2 C6.5 diabody as a PET radiotracer to monitor HER2 status and predict response to trastuzumab treatment[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1509-1520. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-1654.
- [ 57] Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat; a diversity of interactions on a common structural framework[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(8): 311-316.
- [ 58] Zahnd C, Kawe M, Stumpp MT, et al. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins; effects of affinity and molecular size[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1595-1605. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-2724.
- [ 59] Goldstein R, Sosabowski J, Livanos M, et al. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 42(2): 288-301. DOI:10.1007/s00259-014-2940-2.
- [ 60] Mironova KE, Chernykh ON, Ryabova AV, et al. Highly specific hybrid protein DARPin-mCherry for fluorescent visualization of cells overexpressing tumor marker HER2/neu[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, 79(12): 1391-1396. DOI:10.1134/S0006297914120141.
- [ 61] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448. DOI:10.1038/363446a0.
- [ 62] Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, et al. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer[J]. *FASEB J*, 2011, 25(7): 2433-2446. DOI:10.1096/fj.10-180331.
- [ 63] D' Huyvetter M, Aerts A, Xavier C, et al. Development of  $^{177}\text{Lu}$ -nanobodies for radioimmunotherapy of HER2-positive breast cancer; evaluation of different bifunctional chelators[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, 7(2): 254-264. DOI:10.1002/cmim.491.
- [ 64] Xavier C, Blykers A, Vaneycken I, et al.  $^{18}\text{F}$ -nanobody for PET imaging of HER2 overexpressing tumors[J]. *Nucl Med Biol*, 2016, 43(4): 247-252. DOI:10.1016/j.nuclmedbio.2016.01.002.
- [ 65] Vaidyanathan G, McDougald D, Choi J, et al. Preclinical evaluation of  $^{18}\text{F}$ -labeled anti-HER2 nanobody conjugates for imaging HER2 receptor expression by immuno-PET[J]. *J Nucl Med*, 2016, 57(6): 967-973. DOI:10.2967/jnumed.115.171306.
- [ 66] Massa S, Vikani N, Betti C, et al. Sortase A-mediated site-specific labeling of camelid single-domain antibody-fragments; a versatile strategy for multiple molecular imaging modalities[J/OL]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2016[2016-08-03]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmim.1696/pdf>. DOI:10.1002/cmim.1696.
- [ 67] 朱媛, 段小艺, 王瑞峰, 等. 乳腺癌 HER2 靶向分子探针的制备及体外 MRI 初步研究[J]. *中国医学影像学杂志*, 2014, 22(5): 336-339. DOI:10.3969/j.issn.1005-5185.2014.05.005.
- Zhu Y, Duan XY, Wang RF, et al. Preparation of HER2-targeted molecular probe and its MR imaging in Vitro[J]. *Chin J Med Imaging*, 2014, 22(5): 336-339.
- [ 68] Ding N, Sano K, Kanazaki K, et al. In Vivo HER2-Targeted Magnetic resonance tumor Imaging Using Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Anti-HER2 Fragment Antibody[J/OL]. *Mol Imaging Biol*, 2016[2016-08-03]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s11307-016-0977-2>. DOI:10.1007/s11307-016-0977-2.
- [ 69] Yang H, Cai W, Xu L, et al. Nanobubble-Affibody; Novel ultrasound contrast agents for targeted molecular ultrasound imaging of tumor[J]. *Biomaterials*, 2015, 37: 279-288. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.10.013.
- [ 70] Dong X, Gu Y. Application of optical molecular imaging technology in the diagnosis and treatment of diseases[J]. *J Chin Pharm Univ*, 2014, 45(2): 145-152. DOI:10.11665/j.issn.1000-5048.20140203
- [ 71] Ag D, Bongartz R, Dogan LE, et al. Biofunctional quantum dots as fluorescence probe for cell-specific targeting[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 114: 96-103. DOI:10.1016/j.colsurfb.2013.09.033.
- [ 72] Rakovich TY, Mahfoud OK, Mohamed BM, et al. Highly sensitive single domain antibody-quantum dot conjugates for detection of HER2 biomarker in lung and breast cancer cells[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(6): 5682-5695. DOI:10.1021/nn500212h.
- [ 73] Tu CC, Chen KP, Yang TA, et al. Silicon quantum dot nanoparticles with antifouling coatings for immunostaining on live cancer cells[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(22): 13714-13723. DOI:10.1021/acsami.6b02318.
- [ 74] Michalska M, Florczak A, Dams-Kozłowska H, et al. Peptide-functionalized ZCIS QDs as fluorescent nanoprobe for targeted HER2-positive breast cancer cells imaging[J]. *Acta Biomater*, 2016, 35: 293-304. DOI:10.1016/j.actbio.2016.02.002.
- [ 75] Zhao N, Liu S, Jiang Q, et al. Small-protein-stabilized semiconductor nanoprobe for targeted imaging of cancer cells[J]. *ChemBiochem*, 2016, 17(13): 1202-1206. DOI:10.1002/cbic.201600219.