

文章编号 1006-8147(2019)03-0210-05

论著

## AGR3 在乳腺癌细胞中的功能研究

张金曼, 许乔, 马勇杰, 谷峰

(天津医科大学肿瘤医院乳腺病理科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

**摘要** 目的: 构建稳定过表达前梯度蛋白 3(AGR3)或者降表达 AGR3 的乳腺癌细胞系, 探讨 AGR3 在乳腺癌细胞系中的功能。方法: 构建 AGR3 过表达以及降表达的慢病毒载体, 在 293T 细胞中包装成慢病毒, 分别感染 MDA-MB-231 细胞系获得稳定过表达 AGR3 的细胞株, 感染 T47D 细胞系获得稳定降表达 AGR3 的细胞株。通过 Western blot 技术检测细胞中 AGR3 的表达情况。利用增殖实验检测细胞的增殖速度。通过 Transwell 实验检测细胞的迁移、侵袭能力。MTT 法检测在不同浓度下 5-氟尿嘧啶(5-FU)、紫杉醇(PAC)处理 48 h 后, 细胞的存活情况。结果: 稳定过表达 AGR3 的 MDA-MB-231 细胞系, 细胞的增殖速度更快, 迁移、侵袭能力明显增强; 在 5-FU 处理下, 存活率较对照组低, 在 PAC 处理下, 存活率较对照组高。稳定降表达 AGR3 的 T47D 细胞系, 细胞的增殖速度显著下降。结论: AGR3 的表达与乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力呈显著正相关, 与细胞对 5-FU 的敏感性也呈正相关, 而与细胞对 PAC 的敏感性则呈负相关。

**关键词** 乳腺癌; AGR3; 增殖; 迁移; 侵袭; 5-氟尿嘧啶; 紫杉醇**中图分类号** R737.9**文献标志码** A

## Study of the effects of AGR3 on breast cancer cell lines

ZHANG Jin-man, XU Qiao, MA Yong-jie, GU Feng

(Department of Breast Cancer Pathology and Research Laboratory, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the function of AGR3 in breast cancer cell lines by screening the stable breast cancer cell line expressing AGR3 protein or AGR3-silenced breast cancer cell line. **Methods:** First lentiviral vector pCDH-p-3×flag-AGR3-HA and pLVX-ZsGreen-shAGR3 were constructed, and then the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and T47D were infected with lentivirus collected from 293T cell for stable expression. The protein expression level of AGR3, cell survival ratio, migration and invasion were detected by Western blot, proliferation assay and transwell assay, respectively. The cell viability was tested using the MTT colorimetric method after 48 hours of exposure to 5-FU or PAC at different concentrations. **Results:** The cell line MDA-MB-231 with stable expression of AGR3 significantly enhanced cell proliferation, migration and invasion abilities. Compared with control group, survival rate for AGR3 overexpression group cell was significantly decreased after the treatment of 5-FU; and the cell survival rate was increased after exposure to PAC. AGR3 knockdown inhibited cell proliferation ability in the T47D cell line. **Conclusion:** Up-regulation of AGR3 gene expression may significantly increase cell proliferation and metastasis, promote the sensitivity to 5-FU and inhibit the sensitivity of PAC.

**Key words** breast cancer; AGR3; proliferation; migration; invasion; 5-FU; PAC

乳腺癌是全世界女性中最为频发的癌症<sup>[1]</sup>。从 21 世纪开始, 乳腺癌被归类为女性最常见的侵袭性恶性肿瘤<sup>[2]</sup>, 并且是导致女性癌症死亡的主要原因<sup>[3]</sup>。人类前梯度蛋白(AGR)家族, 由 3 个成员组成, 即 TXNDC12(AGR1)、AGR2 和 AGR3; 其中, 前梯度蛋白 3(anterior gradient protein 3, AGR3)又称乳腺癌膜蛋白 11(BCMP 11), 该蛋白在许多肿瘤中均有过表达, 其被认为是一种雄激素调节基因, 在人前列

腺癌中表达明显升高<sup>[4-5]</sup>。且 AGR3 在乳腺癌中的表达与雌激素受体 ER $\alpha$  以及肿瘤分级呈正相关, 与低级别和中等级别乳腺肿瘤的不利预后也相关, 表明 AGR3 是一种独立的预后影响因素<sup>[6]</sup>; 此外, 肝内胆管癌中也有 AGR3 蛋白表达<sup>[7]</sup>, 并被认为是肝内胆管癌的诊断指标<sup>[8]</sup>, 而肝细胞癌中则未检测到 AGR3 表达<sup>[7]</sup>。然而, AGR3 在肿瘤发生中的具体作用尚不清楚。本研究通过慢病毒感染筛选出稳定过表达 AGR3 的 MDA-MB-231 细胞株以及稳定降表达 AGR3 的 T47D 细胞株, 进而探究 AGR3 蛋白对肿瘤增殖、迁移、侵袭能力以及耐药性的影响。

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(81672636)**作者简介** 张金曼(1993-), 女, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学; 通信作者: 谷峰, E-mail: fenggumayo@163.com。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系和主要试剂** 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、T47D 购自美国 ATCC(American Type Culture Collection), 胎牛血清 (Hyclone 公司), 细胞培养基 (GIBCO 公司), 磺酰罗丹明 B(SRB)(Sigma 公司), 发光细胞活性检测试剂盒 (Promega 公司), Transwell 小室 (Corning 公司), 四甲基偶氮唑盐 (MTT) (Sigma 公司), 聚凝胺 (polybrene)(Sigma 公司), 嘌呤霉素 (puromycin)(GIBCO 公司), 遗传霉素 (Geneticin)(ThermoFisher 公司), PCR 引物购自华大基因公司, 胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司), 限制性内切酶 Nhe1、BamH1 购自 NEB 公司, 质粒小提试剂盒 (天根生物科技(北京)有限公司), flag 抗体 (碧云天生物技术有限公司), AGR3 抗体 (abcam 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** MDA-MB-231 细胞系用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养, T47D 细胞系用含 15% 胎牛血清的 1640 培养, 置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中。

**1.2.2 重组质粒的构建** 过表达 AGR3 质粒以乳腺癌细胞系 T47D 的 cDNA 为模板, 利用 PCR 法扩增出含有 3×flag 标签的 AGR3 编码序列(引物见表 1), 用限制性内切酶 Nhe1、BamH1 对扩增序列以及质粒空载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro(pCDH)进行双酶切, 并回收纯化, 纯化后的产物进行连接并转化到 DH5α 感受态宿主菌, 接种于固体 LB 培养板, 选取单克隆菌落接种于 LB 液体培养基进行扩增, 提取质粒验证, 从而获得重组过表达质粒 pCDH-p-3×flag-AGR3-HA; 降表达 AGR3 质粒将引物退火 (引物见表 1), 用限制性内切酶 EcoR1、BamH1 对质粒空载体 pLVX-ZsGreen-Neo 进行双酶切, 与退火引物直接连接, 转化 DH5α 感受态宿主菌, 最终提取质粒并验证, 获得 pLVX-ZsGreen-shAGR3 质粒。

**1.2.3 慢病毒载体的包装** 在 10 cm dish 中提前铺好 293T 细胞, 待细胞贴壁并长至 80%~90%时, 将目的质粒、包装质粒 1、包装质粒 2 共转染入 293T

细胞, 6~8 h 换液, 48 h 收集培养上清于离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清置于 -80 °C 保存。

**1.2.4 细胞的感染** 在 3.5 cm dish 中铺入约 30%~40% 的乳腺癌细胞, 次日待细胞贴壁后, 弃去培养液, 重新加入 1 mL 新鲜培养液和 1 mL 制备好的病毒液, 以及 2 μL polybrene (10 mg/mL), 5 h 后更换培养液。待慢病毒感染 48 h 后, 过表达细胞系加入 puromycin (2 μg/mL) 进行药筛, 降表达细胞系加入 Geneticin (2 mg/mL) 进行药筛, 药筛 1 周后即可用于后续实验。

**1.2.5 Western blot 检测** 弃去细胞培养液, 加入 PBS 冲洗 3 次, 弃干 PBS, 加入裂解液于冰上裂解细胞蛋白, 测定蛋白浓度并定量, 对蛋白进行 SDS-PAGE 变性电泳, 并转至硝酸纤维素膜上, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 荧光二抗室温孵育 50 min, TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min。用双色红外激光成像系统进行曝光。

**1.2.6 ATP 法检测细胞增殖** 将细胞接种于 24 孔板, 使其第 2 天汇合度小于 10%, 从第 2 天开始检测, 将 24 孔板弃去培养液, 每孔加入 150 μL 用 PBS 1:1 稀释的发光细胞活性检测试剂, 把 24 孔板放于摇床上 175 r/min 摇晃 5 min 后, 将孔内液体转入 1.5 mL 离心管, 直接放入发光检测仪内进行检测, 连续测 5 d。

**1.2.7 SRB 法检测细胞增殖** 将细胞接种于 24 孔板, 使其第 2 天汇合度小于 10%, 从第 2 天开始检测, 向 24 孔板中加入 500 μL 4 °C 预冷的 10% 的 TCA 溶液, 室温放置 5 min, 再放入 4 °C 冰箱固定 1 h, 用 DDW 冲洗 5 次, 晾干后, 加入 0.4% 的 SRB 染液染色 30 min, 用 1% 的乙酸冲洗 5 次, 晾干, 加入 10 mol/L 的 Tris 溶液溶解, 测定波长为 564 nm 时的吸光度值, 连续测 5 d。

**1.2.8 细胞迁移实验** 向 Transwell 小室上室加入 200 μL 无血清的 DMEM 重悬的 3×10<sup>4</sup> 个细胞, 下室加入 600 μL 含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 放置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中培养 16 h 后, 取

表 1 质粒构建引物序列信息

Tab 1 Primer sequence information of plasmid construction

引物名称	引物序列
Forward primer-1	5'-GAGAGCTAGCGCCACCATGATGCTACACTCAGCT-3'
Reverse primer-1	5'-TCTCGGATCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATTAGCTCTGACTGAATAAGTCTTAATGCTTT-3'
Forward primer-2	5'-GATCCGCCCTTCACTTCAAAGAAGTCACTCGAGTGACTTCTTTGAAGTGAAGGCTTTTTC-3'
Reverse primer-2	5'-AATTCAAAAAGCCTTCACTTCAAAGAAGTCACTCGAGTGACTTCTTTGAAGTGAAGGCG-3'

Forward primer-1 和 Reverse primer-1 分别表示构建 pCDH-p-3×flag-AGR3-HA 的上下游引物; Forward primer-2 和 Reverse primer-2 分别表示构建 pLVX-ZsGreen-shAGR3 的上下游引物

出,用棉签擦拭掉内室细胞,将 Transwell 小室用 4% 的 PFA 溶液固定 30 min,再用吉姆萨染液染色 45 min,用 DDW 清洗 3 次,封片,显微拍照并计数。

**1.2.9 细胞侵袭实验** 向 Transwell 小室内铺入用无血清的 DMEM 培养液 2:1 稀释的 ECM 基质胶 35  $\mu$ L,置于 37  $^{\circ}$ C 凝胶 1 h 以上取出,向上室加入 200  $\mu$ L 含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬的  $1 \times 10^5$  个细胞,下室加入 600  $\mu$ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,放置于含 5%  $\text{CO}_2$  的 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h 后取出,固定、染色,并显微拍照计数。

**1.2.10 MTT 法检测细胞对 5-FU、PAC 耐药的影响** 将细胞以  $2.5 \times 10^4$  个/孔的数量接种于 24 孔板,待细胞贴壁后,弃去培养液,分别加入 500  $\mu$ L 终浓度为 1、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $1.5 \times 10^4$   $\mu$ g/mL 的 5-FU 培养液,或者 500  $\mu$ L 终浓度为 15、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $5 \times 10^4$  ng/mL 的 PAC 培养液培养 48 h 后,加入 MTT(噻唑蓝)溶液(5 mg/mL),孵箱内继续孵育 4 h,弃去孔内液体,每孔加入 500  $\mu$ L DMSO,避光震荡 10 min,再从孔内吸出 150  $\mu$ L 液体加入 96 孔板,吸 3 次,即做 3 个复孔,用酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长处吸光度值。

**1.3 统计学分析** 采用统计软件 SPSS19.0 进行数据分析,两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 重组质粒的构建和酶切鉴定** pCDH-p-3 $\times$ flag-AGR3-HA 重组质粒(3 $\times$ flag-AGR3-HA),经 NheI、BamHI 进行双酶切后,可获得长度为 543 bp 和 7 435 bp 的片段产物,进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示条带位置与预期一致(图 1A),表明目的片段已经成功插入载体 pCDH 中,质粒构建成功;pLVX-ZsGreen-shAGR3 重组质粒(ZsGreen-shAGR3),经 XhoI 进行双酶切后,可获得长度为 1 346 bp 和 7 765 bp 的片段产物,进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示条带位置也与预期一致(图 1B),质粒构建成功。

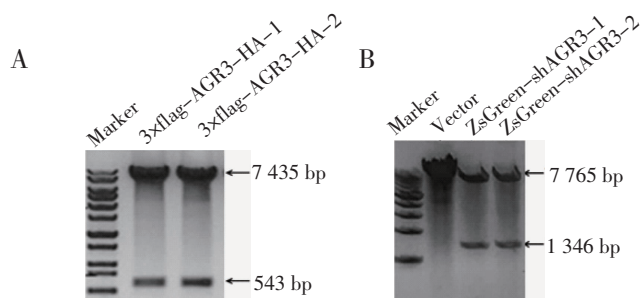


图 1 重组质粒的双酶切鉴定结果

Fig 1 Recombinant plasmids confirmed by double enzyme digestion

**2.2 Western blot 检测目的蛋白的表达** 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 用慢病毒感染后,获得稳定过表达目的蛋白的细胞株:Control、3 $\times$ flag-AGR3-HA/MDA-MB-231,Western blot 检测细胞系中目的蛋白的表达情况,结果显示 flag 与 AGR3 融合蛋白在 MDA-MB-231 细胞中稳定表达(图 2)。人乳腺癌细胞系 T47D 用慢病毒感染后,获得稳定降表达目的蛋白的细胞株:Control、shAGR3/T47D,Western blot 结果显示 AGR3 蛋白在 T47D 细胞中稳定降表达(图 3)。

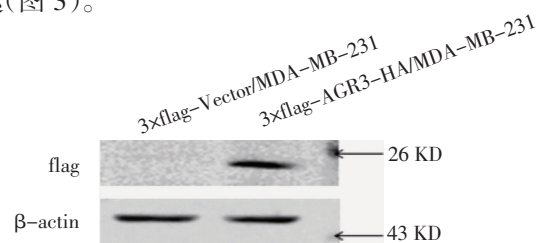


图 2 Western blot 检测 MDA-MB-231 细胞系中目的蛋白的表达

Fig 2 The expression of AGR3 in MDA-MB-231 cell by Western blot analysis

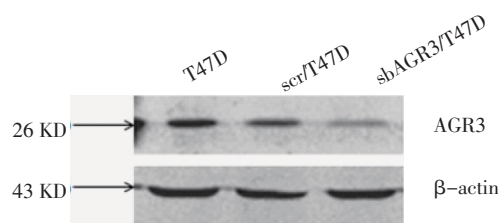
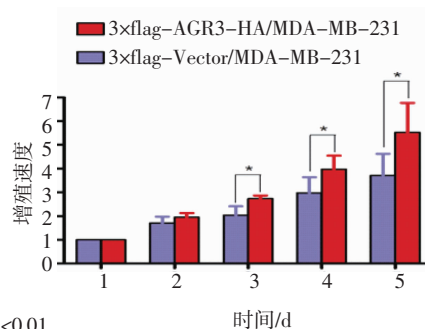


图 3 Western blot 检测 T47D 细胞系中目的蛋白的表达

Fig 3 The expression of AGR3 in T47D cell by Western blot analysis

**2.3 AGR3 过表达对细胞增殖能力的影响** ATP 实验和 SRB 实验检测了不同细胞系的增殖能力,ATP 实验结果表明,AGR3 稳定过表达的细胞系增殖速度较对照组细胞系快(图 4),相反,AGR3 稳定降表达的细胞系增殖速度显著降低(图 5),差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),SRB 实验结果与 ATP 实验结果一致,表明 AGR3 稳定过表达的细胞系增殖能力显著高于对照组细胞系(图 6),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。



\* $P < 0.01$

图 4 ATP 法检测过表达 AGR3 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响

Fig 4 Effect of AGR3 on MDA-MB-231 cell proliferation ability by ATP assay

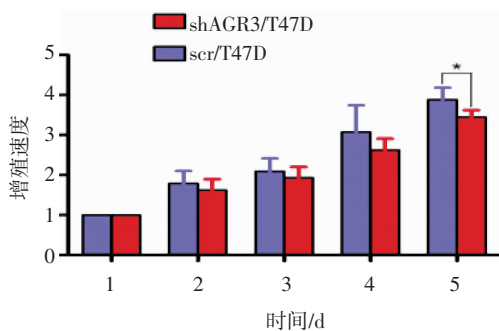
\* $P<0.01$ 

图5 ATP法检测降表达AGR3对T47D细胞增殖能力的影响

Fig 5 Effect of AGR3 on T47D cell proliferation ability by ATP assay

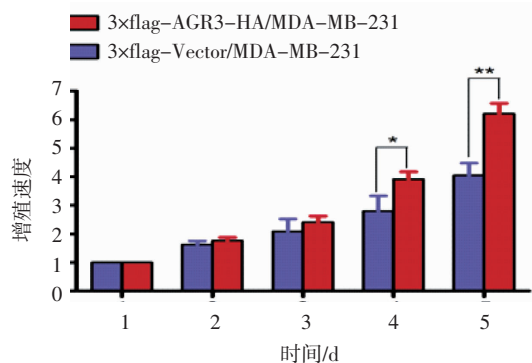
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 

图6 SRB法检测过表达AGR3对细胞增殖能力的影响

Fig 6 Effect of AGR3 on cell proliferation ability by SRB assay

2.4 AGR3过表达对细胞迁移、侵袭能力的影响 Transwell小室实验对细胞系的迁移和侵袭能力进行了检测,结果显示,AGR3稳定过表达组与对照组细胞相比迁移的细胞数目明显增多(图7),差异有统计学意义( $P<0.001$ ),表明AGR3对细胞的迁移能力具有促进作用;与迁移能力变化相一致的是,AGR3过表达组细胞的侵袭的细胞数目也增加(图8),差异有统计学意义( $P<0.05$ ),表明AGR3对细胞的侵袭能力同样具有促进作用。

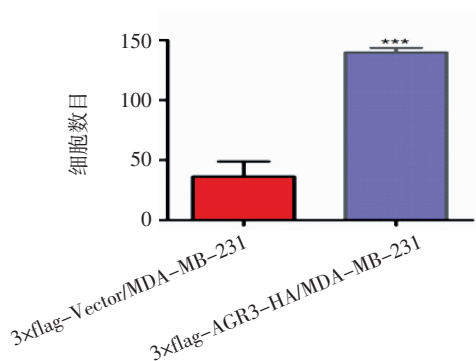


图7 Transwell小室实验检测过表达AGR3对细胞迁移能力的影响

Fig 7 Effect of AGR3 on cell migration ability by Transwell assay

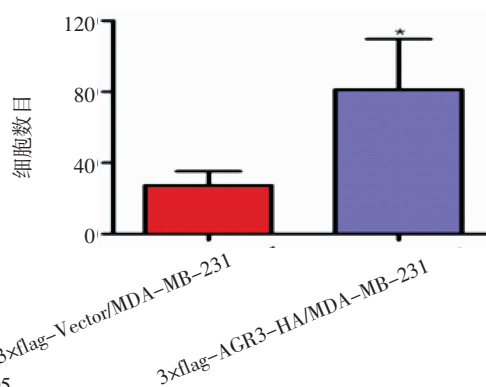
\* $P<0.05$ 

图8 Transwell小室实验检测过表达AGR3对细胞侵袭能力的影响

Fig 8 Effect of AGR3 on cell invasion ability by Transwell assay

2.5 AGR3过表达的细胞对5-FU、PAC药物敏感性的影响 采用MTT法检测用不同浓度的5-FU或PAC处理细胞48h后,细胞的生存情况。MTT结果显示:当5-FU浓度为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$   $\mu\text{g/mL}$ 时,AGR3高表达的细胞系的存活率显著低于对照组细胞( $P<0.05$ ,图9),当5-FU浓度为 $10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$ 时,存活率相差最为显著( $P<0.01$ ,图9),同时 $\text{IC}_{50}$ 值也显著低于对照组细胞( $P<0.05$ ,图9),说明AGR3过表达后,细胞对5-FU敏感性增高;当PAC浓度为 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$   $\text{ng/mL}$ 时,相较于对照组细胞,AGR3高表达组细胞的存活率显著增高( $P<0.05$ ,图10),同时 $\text{IC}_{50}$ 值也显著高于对照组细胞( $P<0.05$ ,图10),说明AGR3过表达组细胞对PAC不敏感。

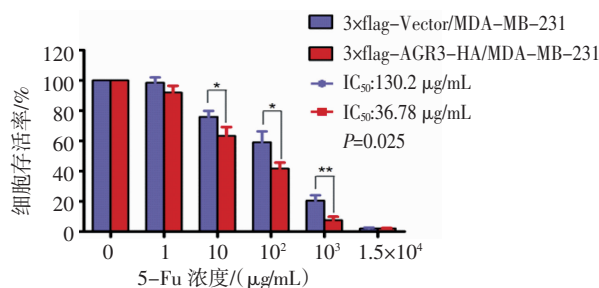
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 

图9 AGR3过表达的细胞对5-FU敏感性的变化

Fig 9 The sensitivity changes in AGR3 over expression cell lines to 5-FU

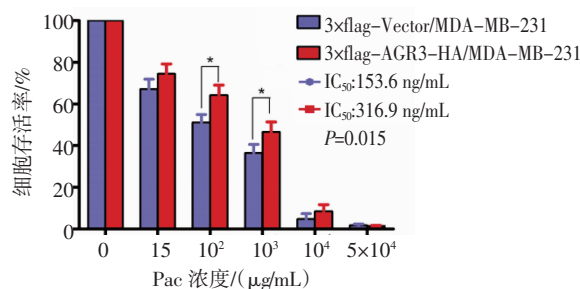
\* $P<0.05$ 

图10 AGR3过表达的细胞对PAC敏感性的变化

Fig 10 The sensitivity changes in AGR3 overexpression cell lines to PAC

### 3 讨论

乳腺癌是女性最常见的肿瘤,发生于乳腺腺体和导管。在发达国家中,乳腺癌是导致女性癌症死亡的主要原因之一,且发病率位于女性恶性肿瘤首位,近些年来,乳腺癌在我国女性中的发病率也在逐渐升高,每年大约有 50 万左右的女性因乳腺癌的复发转移而死亡,因此,乳腺癌的复发转移是临床的重点问题之一。

AGR 家族都属于蛋白质二硫异构酶蛋白家族<sup>[9]</sup>。有证据表明,蛋白质二硫异构酶家族中的蛋白 AGR3 在乳腺癌的发生发展中具有潜在的作用,并有报道称,与正常乳腺组织相比,AGR3 在乳腺癌中被上调。然而,AGR3 是否能够作为预后影响因子、生物标记物以及在乳腺癌中过表达的临床影响尚不十分清楚。

除乳腺肿瘤组织之外,AGR3 在多种肿瘤组织中均有表达,作用也并不一致,一方面,AGR3 在浆液性卵巢癌中可以作为预后良好的标志,而另一方面,在人肺腺癌细胞系 H1299 的异种移植小鼠模型中,又表现出显著的致癌潜能<sup>[10]</sup>。但在人类乳腺癌中,到目前为止还没有关于 AGR3 具有生物标志物潜力的研究。不过,AGR3 同源蛋白 AGR2 作为一种原癌基因已经被科学界广泛认可,在各种恶性肿瘤中促进肿瘤的侵袭性表型和不良预后<sup>[11-14]</sup>。有研究表明 AGR2 和 AGR3 可能控制着肿瘤生物学的类似方面,包括细胞周期控制、分化、迁移、侵袭和转移<sup>[13]</sup>。最近有研究表明前梯度蛋白家族中 AGR2 蛋白可以通过自分泌和旁分泌效应在控制肿瘤侵袭性中起到潜在的作用<sup>[14-15]</sup>,推测 AGR3 可能也是通过相似机制起到致癌的作用。

本研究,首次探究了 AGR3 蛋白作为一种致癌基因在乳腺癌细胞系中所发挥的功能,通过慢病毒感染的方法在乳腺癌细胞系中过表达或者降表达目的蛋白 AGR3,证明了 AGR3 蛋白对乳腺癌细胞系增殖、迁移和侵袭能力的促进作用;在耐药性方面,结果显示 5-FU 对 AGR3 高表达的乳腺癌细胞系生长的抑制能力增强,而 PAC 对其生长抑制能力减弱,表明在乳腺癌中,AGR3 与 5-FU 和 PAC 的敏感性相关。

综上,AGR3 蛋白在乳腺癌细胞系中的作用,提示着 AGR3 在乳腺癌中可能具有作为生物标志物以

及肿瘤治疗重要靶点的潜能。因此,对 AGR3 在乳腺癌中具体的分子作用机制有待更加深入的探讨。

#### 参考文献:

- [1] Shapira N. The potential contribution of dietary factors to breast cancer prevention[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26(5): 385
- [2] Chiou Y S, Li S, Ho C T, et al. Prevention of breast cancer by natural phytochemicals: focusing on molecular targets and combinational strategy[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(23): e1800392
- [3] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69
- [4] Vaarala M H, Hirvikoski P, Kauppila S A. Identification of androgen-regulated genes in human prostate[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(3): 466
- [5] Bu H J, Schweiger M R, Manke T, et al. Anterior gradient 2 and 3 – two prototype androgen-responsive genes transcriptionally upregulated by androgens and by oestrogens in prostate cancer cells[J]. *FEBS J*, 2013, 280(5): 1249
- [6] Garczyk S, Von Stillfried S, Antonopoulos W A, et al. AGR3 in breast cancer: prognostic impact and suitable Serum-Based biomarker for early cancer detection[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122106
- [7] Obacz J, Brychtova V, Podhorec J, et al. Anterior gradient protein 3 is associated with less aggressive tumors and better outcome of breast cancer patients[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 1523
- [8] Brychtova V, Zampachova V, Hrstka R, et al. Differential expression of anterior gradient protein 3 in intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(3): 375
- [9] Ivanova A S, Tereshina M B, Ermakova G V, et al. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1279
- [10] Gray T A, MacLaine N J, Michie C O, et al. Anterior Gradient-3: a novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models[J]. *J Immunol Methods*, 2012, 378: 20
- [11] Chevet E, Fessart D, Delom F, et al. Emerging roles for the pro-oncogenic anterior gradient-2 in cancer development[J]. *Oncogene*, 2013, 32(20): 2499
- [12] Salmans M L, Zhao F, Andersen B. The estrogen-regulated anterior gradient 2 (AGR2) protein in breast cancer: a potential drug target and biomarker[J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(2): 204
- [13] Obacz J, Takacova M, Brychtova V, et al. The role of AGR2 and AGR3 in cancer: similar but not identical[J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(3/4): 139
- [14] Arumugam T, Deng D F, Bover L, et al. New blocking antibodies against novel AGR2-C4.4A pathway reduce growth and metastasis of pancreatic tumors and increase survival in mice[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(4): 941
- [15] Tsuji T, Satoyoshi R, Aiba N, et al. Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric Signet-Ring carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(2): 356

(2018-10-16 收稿)