doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.06.007

◇ 药学研究 ◇

苯丁酸钠对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

郭浩^a, 周淑妮^b, 冉瑞智^a作者单位:恩施土家族苗族自治州中心医院,^a肿瘤内科,^b中医心血管内科,湖北 恩施 445000

通信作者:冉瑞智,男,主任医师,研究方向为各种恶性肿瘤的内科治疗(放疗、化疗、靶向、免疫治疗),E-mail:rrz1966@126.com

摘要 目的 观察分析苯丁酸钠(Sodium phenylbutyrate, NaPB)对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响,初步探究其可能的作用机制。**方法** 以不同剂量 NaPB(0 mmol/L、2 mmol/L 和 4 mmol/L)处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株并进行实验分组:对照组,2 mmol/L NaPB 组 4 mmol/L NaPB 组。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测各组乳腺癌细胞的增殖情况,使用流式细胞仪检测细胞凋亡,应用蛋白质印迹法(Western Blot)检测凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和乳腺癌易感基因 1(BRCA1)蛋白表达的水平。**结果** NaPB 能显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的生长增殖,并可诱导乳腺癌细胞凋亡,对照组、2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组乳腺癌细胞的凋亡率分别为(4.25±0.89)%、(14.11±2.98)%和(32.73±1.89)%,两两比较均差异有统计学意义($P < 0.05$),NaPB 可诱导凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达水平下降,而 Bax 表达水平升高,NaPB 的抗肿瘤作用在高剂量组中表现得更为明显。与对照组相比 NaPB 可显著下调 BRCA1 蛋白的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** NaPB 可抑制乳腺癌细胞增殖和诱导细胞凋亡,其作用机制可能与 NaPB 下调 BRCA1 表达有关。**关键词**:乳腺癌; 苯丁酸钠; 抗肿瘤联合化疗方案; 细胞凋亡; BRCA1 蛋白质

Effects of sodium phenylbutyrate on proliferation and apoptosis of human breast cancer cell

GUO Hao^a, ZHOU Shuni^b, RAN Ruizhi^a

Author Affiliation: ^aDepartment of Oncology Medicine, ^bDepartment of Cardiovascular Medicine, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China

Abstract: Objective To study the effects of sodium phenylbutyrate (NaPB) on the proliferation and apoptosis of human breast cancer cell Line MDA-MB-231, and to explore the probable mechanism. **Methods** MDA-MB-231 cells were treated with different concentration of NaPB (0 mmol/L, 2 mmol/L and 4 mmol/L), and assigned into control group, 2 mmol/L NaPB group and 4 mmol/L NaPB group. Tetramethylazazole salt microenzyme reaction colorimetric method (MTT) assay was performed to detect the proliferation of MDA-MB-231 cells. The cell apoptosis was tested using flow cytometry. Western Blot assay was carried out to examine the apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and breast cancer gene 1 (BRCA1). **Results** NaPB significantly inhibited the growth and proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells and induced apoptosis of breast cancer cells, the average apoptosis rate in control group, 2 mmol/L and 4 mmol/L NaPB group was (4.25±0.89)%, (14.11±2.98)% and (32.73±1.89)%, respectively, and the difference between the two pairs was statistically significant ($P < 0.05$). NaPB decreased the expression level of apoptosis-related protein Bcl-2 and increased the expression level of Bax, and the anti-tumor effect of NaPB was more obvious in the high-dose group. Compared with the control group, NaPB significantly reduced the expression of BRCA1 protein, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NaPB can inhibit breast cancer cell proliferation and induce apoptosis, and its mechanisms may be related to down-regulation of BRCA1 expression.

Key words: Breast neoplasms; Sodium phenylbutyrate; Antineoplastic combined chemotherapy protocols; Apoptosis; BRCA1 protein

乳腺癌是全世界女性最常见的恶性肿瘤之一,在我国乳腺癌的年龄标准化发病率为 30.69/10 万,位居女性恶性肿瘤的首位,居癌症相关死因的第 5 位,我国乳腺癌病人发病年龄多在 45~55 岁,近些年乳腺癌发病也有明显的年轻化趋势,目前手术、化疗、放疗、内分泌及生物治疗等为主的综合治疗是

乳腺癌标准的治疗方法,乳腺癌及其治疗损伤给女性病人心理健康和生活质量带来了严重的影响,乳腺癌的临床治疗疗效仍有待进一步提高^[1-2]。

苯丁酸钠(Sodium phenylbutyrate, NaPB)属于苯丁酸盐及其衍生物的一种,NaPB 可通过抑制 DNA 修复、诱导细胞凋亡和细胞周期停滞等机制抑制多

种肿瘤细胞的生长和增殖^[3],有研究提示苯丁酸盐抗肿瘤作用可能与乳腺癌易感基因1(Breast cancer gene 1, BRCA1)有关^[4]。BRCA1是一种抑癌基因,其编码的BRCA1蛋白在乳腺癌的发病、预防、治疗及预后中起到了重要作用^[5]。NaPB对乳腺癌细胞生长增殖的影响及其作用机制尚无确切结论,本实验于2018年10月至2019年1月以MDA-MB-231细胞为研究对象,探讨NaPB对乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响,同时通过分析NaPB对BRCA1蛋白表达的影响初步探究其作用机制。

1 材料与与方法

1.1 主要材料与试剂 人乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞株购自中国医学科学院上海生物研究所细胞资源中心。NaPB(上海金锦乐实业有限公司生产,批号20171105),溶解于双蒸水中使用^[6]。胎牛血清、DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶均购于美国Gibco Life Technologies公司。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)溶液(美国Sigma公司生产,型号规格:M2128-100MG,批号20180212)。膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染法细胞凋亡检测试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司生产,批号20180503)。BRCA1抗体(型号ab213929)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体(型号ab32124)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(型号ab32503)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(型号ab8226)、过氧化物酶标记山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗均购于艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.2 细胞培养技术 将人乳腺癌细胞系MDA-MB-231接种于含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养液中,培养基中加入100 U/mL青霉素和100 mg/L的链霉素,细胞维持培养于37℃、含有5%的二氧化碳、95%湿度的培养箱中,隔天换液,用0.25%的胰蛋白酶消化传代后,离心制成单细胞悬液以备NaPB处理、增殖能力检测、蛋白质印迹法等后续实验。

1.3 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测细胞增殖活力 取处于对数生长期的MDA-MB-231细胞接种于96孔板中(细胞浓度 5.0×10^4 /mL),过夜培养后加入不同剂量的NaPB(0 mmol/L、2 mmol/L和4 mmol/L)处理24 h、48 h和72 h后进行实验。每组设置5个复孔,每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μ L,37℃孵育4 h后终止培养。弃上清后每孔加入150 μ L二甲基亚砷(DMSO)溶解MTT结晶,摇床震荡混匀10 min,然后在酶标仪上选择490 nm波长,最后测定各孔的光密度(OD)值。MTT法得到

各组细胞培养孔中OD值的复孔平均值。细胞增殖存活率=(实验组平均OD值/对照组平均OD值) $\times$ 100%,实验检测重复3次。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 将处于对数生长期的MDA-MB-231细胞以 1.0×10^5 密度接种于6孔板上,于培养体系中与药物共同孵育48 h后,1 500 r/min离心5 min,收集细胞,加入孵育缓冲液洗涤,离心,去上清液,使用500 μ L上样缓冲液(Binding buffer)悬浮细胞,然后再进行荧光标记,先加入5 μ L Annexin V-FITC,后加入5 μ L PI荧光标记溶液,轻轻混匀,室温下避光孵育20 min,于1 h内使用流式细胞仪进行检测。

1.5 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和BRCA1蛋白的表达 收集实验各组细胞,根据蛋白提取试剂盒操作说明于冰上裂解提取各组细胞的目标总蛋白,按照BCA蛋白质定量试剂盒操作说明进行实验,测定各组细胞的目标蛋白质的浓度,然后经灌胶、上样处理后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离各组蛋白质,应用湿转法将分离的蛋白条带转移至聚偏二氯乙烯膜(PVDF膜),封闭后并分别与抗人Bcl-2、Bax、BRCA1和 β -actin一抗置4℃水平摇动过夜,再加入与辣根过氧化物酶标记的二抗反应,洗膜、风干后使用辣根过氧化物酶(HRP)-增强化学发光法(ECL)进行显影,使用 β -actin作为内参进行相对含量的计算和分析。

1.6 统计学方法 应用SPSS 20.0软件包进行统计学数据的整理和分析。实验中计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数的比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用Bonferroni校正法, $P < 0.05$ (两两比较时 $P < 0.0167$)表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaPB对MDA-MB-231细胞增殖活力的影响 实验根据NaPB的剂量(0 mmol/L、2 mmol/L和4 mmol/L)不同将乳腺癌MDA-MB-231细胞分为对照组(0 mmol/L NaPB组)、2 mmol/L NaPB组4 mmol/L NaPB组。MTT实验结果表明NaPB作用于MDA-MB-231细胞24 h后,对照组、2 mmol/L NaPB组4 mmol/L NaPB组细胞生存率分别为(100.00 $\pm$ 0.00)%、(82.05 $\pm$ 7.11)%和(67.46 $\pm$ 4.77)%,三组间比较差异有统计学意义($F = 32.174, P < 0.001$);48 h后,对照组、2 mmol/L NaPB组4 mmol/L NaPB组细胞生存率分别为(100.00 $\pm$ 0.00)%、(74.33 $\pm$ 4.46)%和(58.75 $\pm$ 5.12)%,三组间比较差异有统计学意义($F = 82.864, P < 0.001$);72 h后,对照组、2 mmol/L NaPB

组 4 mmol/L NaPB 组细胞生存率分别为(100.00±0.00)%、(70.63±4.26)%和(48.98±3.59)%，三组间比较差异有统计学意义($F=184.127, P<0.001$)。该结果提示 NaPB 可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖活力，且随着剂量的增加其抑制作用有增加的趋势。

2.2 NaPB 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 流式细胞学检测 MDA-MB-231 细胞凋亡结果(图 1A)表明，对照组、2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组细胞的凋亡率分别为(4.25±0.89)%、(14.11±2.98)%和(32.73±1.89)%，三组比较差异有统计学意义($F=166.668, P<0.001$)；两两比较采用 Bonferroni 校正法，2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组细胞凋亡率均明显低于对照组($P=0.002; P<0.001$)；2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组比较差异有统计学意义($P<0.001$)。

应用蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达水平结果表明，对照组、2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组 Bcl-2 蛋白相对灰度值分别为(0.78±0.02)、(0.58±0.04)和(0.39±0.02)，三组比较差异有统计学意义($F=162.437, P<0.001$)；与对照组相比，2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组 Bcl-2 的表达均有明显降低($P<0.001; P<0.001$)；4 mmol/L NaPB 组 Bcl-2 的表达低于 2 mmol/L NaPB 组($P<0.001$)。凋亡相关蛋白 Bax 的相对灰度值对照组、2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组分别为(0.26±0.02)、(0.41±0.02)和(0.69±0.04)，三组比较差异有统计学意义($F=210.437, P<0.001$)；与对照组相比，2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组 Bax 的表达均有明显增加($P=0.001; P<0.001$)；4 mmol/L NaPB 组 Bax 的表达高于 2 mmol/L NaPB 组($P<0.001$)。各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白质印迹法结果见图 1B。以上数据提示 NaPB 可诱导乳腺癌细胞凋亡，且剂量越高诱导作用越明显。

2.3 NaPB 对 MDA-MB-231 细胞 BRCA1 蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测结果表明，应用 NaPB 后 MDA-MB-231 细胞 BRCA1 的表达量显著降低(图 2)，对照组、2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组 Bcl-2 蛋白相对灰度值分别为(0.83±0.03)、(0.61±0.05)和(0.30±0.04)，三组比较差异有统计学意义($F=117.348, P<0.001$)；2 mmol/L NaPB 组和 4 mmol/L NaPB 组 BRCA1 的表达均明显高于对照组($P=0.002; P<0.001$)；4 mmol/L NaPB 组 BRCA1 表达高于 2 mmol/L NaPB 组($P<0.001$)。以上数据表明 NaPB 可抑制乳腺癌细胞中 BRCA1 的表达，且高剂量抑制作用更明显。

3 讨论

化疗与手术、放疗并称为恶性肿瘤的三大治疗方法，乳腺癌通过化疗可以达到临床治愈或者长期生存的效果，探索新的有效的治疗乳腺癌的药物具有重要意义^[7]。

作为一种氨清除剂，在人体内，苯丁酸盐被氧化成苯乙酸盐，再与谷氨酰胺结合以苯乙酰谷氨酰胺的形式从尿中排出，从而介导废物氮的清除，目前是治疗尿素循环障碍和高氨血症的常用药物。然而，体外和体内研究均证明苯丁酸盐及其衍生物具有明显的抗肿瘤作用，其作用包括抑制肿瘤生长、侵袭和迁移，并在不同类型的实体瘤(如舌癌、恶性胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌和肺癌等)以及血液肿瘤(如急性髓性白血病)中诱导细胞分化和凋亡^[6,8-10]。苯丁酸盐及其衍生物抗肿瘤作用的可能机制总结如下：抑制组蛋白去乙酰化酶(HDAC)，抑制肿瘤细胞生长，诱导细胞凋亡，诱导分化，抑制血管生成，抑制 DNA 修复，抑制肿瘤细胞转移以及免疫调节作用。此外，苯丁酸盐及其衍生物的抗肿瘤作用还具有剂量依赖性和细胞类型选择性，因此需要进行针对不同类型的肿瘤进行实验研究以验证其作用^[3]。

目前尚不完全清楚 NaPB 在乳腺癌中的抗癌作用，本研究通过细胞实验初步探究了 NaPB 在乳腺癌药物治疗上的潜在应用价值。结果表明 NaPB 能显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖活力，并可诱导其凋亡，NaPB 可诱导凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达水平下降和 Bax 表达水平升高，NaPB 的抗肿瘤作用在高剂量组中表现得更明显。与本实验的研究结果相似，孙象军等^[11-12]的研究表明 NaPB 可有效地抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖活力，且该作用具有剂量-时间依赖性，其作用机制可能与 NaPB 上调 HOXA5 基因 mRNA 表达水平影响乳腺癌细胞的转录过程有关。研究人员还就 NaPB 对乳腺癌细胞超微结构的影响进行了深入的研究，结果发现应用 NaPB 后可引起乳腺癌细胞形态发生显著改变，主要表现在诱导 MCF-7 细胞向成熟表型方向分化，降低其恶性程度，同时，NaPB 可导致乳腺癌细胞周期发生 G₀/G₁ 期阻滞，影响乳腺癌细胞 DNA 的合成。另外，还有研究发现 NaPB 可以显著抑制 HER2 阳性的乳腺癌 SKBR3 细胞的增殖并诱导 SKBR3 细胞凋亡，同时，NaPB 可增加抗 HER2 受体的单克隆抗体曲妥珠单抗治疗的敏感性，NaPB 的这种作用与 p27^{Kip1} 蛋白的表达增加有关^[13]，但是上述 NaPB 的作用在 HER2 阴性的乳腺癌 HCC1937 细胞中不存在，其原

因可能与苯丁酸盐抗的癌作用具有细胞类型选择性有关。

BRCA1 基因编码的蛋白可作用于 DNA 损伤修复、细胞增殖与凋亡、基因转录调控和细胞周期调节等多种细胞生命活动过程。BRCA1 蛋白的表达水平与乳腺癌的预后及对化疗药物敏感性的影响尚未明确, 现有的研究结果也不一致^[5,14-16]。本实验发现 NaPB 可明显降低乳腺癌细胞 BRCA1 蛋白的表达水平, 该结果提示 NaPB 可能通过调节 BRCA 蛋白水平发挥抗癌作用。类似的, 有研究发现在头颈部恶性肿瘤细胞中, 苯丁酸盐可通过降低 BRCA1 蛋白表达抑制肿瘤细胞的 DNA 损伤性修复, 从而增强了细胞对顺铂的敏感性^[4]。但是, 有研究表明 miR-185 可以通过上调 BRCA1 的表达抑制三阴乳腺癌细胞的增殖与侵袭^[17], 分析其原因可能是 BRCA1 蛋白在不同药物中的作用机制不同造成的。BRCA1 蛋白可通过同源重组参与 DNA 双链的损伤性修复, 研究表明 BRCA1 基因突变的乳腺癌病人由于 BRCA1 蛋白表达量降低, 造成了同源重组修复功能缺陷, 可能对顺铂、卡铂和多聚聚合酶 (PARP) 抑制剂等 DNA 损伤药物更为敏感^[18-19], 而紫杉醇诱导的乳腺癌细胞的凋亡需要 BRCA1 蛋白参与, 故 BRCA1 基因突变可诱导肿瘤细胞对紫杉醇耐药, 此外, BRCA1 对肿瘤细胞的凋亡也具有不同调节功能^[20]。

综上所述, NaPB 可抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长增殖和诱导细胞凋亡, NaPB 可显著降低乳腺癌细胞 BRCA1 蛋白表达水平, 该结果提示 NaPB 可能通过调节 BRCA1 蛋白水平影响 DNA 损伤修复, 从而发挥抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的作用, 这也是 NaPB 抗肿瘤的机制之一, NaPB 介导的 BRCA1 途径有望成为乳腺癌治疗的作用靶点, 该结论有待进一步的研究以明确。

(本文图 1, 2 见插图 6-3)

参考文献

- [1] 杨灵, 宋伟平, 陈程丽, 等. 乳腺癌患者不同阶段的社会支持与生活质量的相关性研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(3): 202-206.
- [2] 李贺, 郑荣寿, 张思维, 等. 2014 年中国女性乳腺癌发病与死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(3): 166-171.
- [3] AL-KEILANI MS, AL-SAWALHA NA. Potential of Phenylbutyrate as Adjuvant Chemotherapy: An Overview of Cellular and Molecular Anticancer Mechanisms[J]. Chemical Research in Toxicology, 2017, 30(10): 1767-1777.
- [4] BURKITT K, LJUNGMAN M. Phenylbutyrate interferes with the Fanconi anemia and BRCA pathway and sensitizes head and neck cancer cells to cisplatin[J]. Mol Cancer, 2008, 7: 24.
- [5] 《BRCA 数据解读中国专家共识》编写组. BRCA 数据解读中国专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(5): 293-297.
- [6] XU Y, ZHENG S, CHEN B, et al. Sodium phenylbutyrate antagonizes prostate cancer through the induction of apoptosis and attenuation of cell viability and migration[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 2825-2833.
- [7] GRAY R, BRADLEY R, BRAYBROOKE J, et al. Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials[J]. Lancet, 2019, 393(10179): 1440-1452.
- [8] 陈伟强, 冯凤兰, 古宏标, 等. 苯丁酸钠对人舌鳞状细胞癌细胞凋亡影响机制的探讨[J]. 中华口腔医学杂志, 2010, 45(7): 416-420.
- [9] JIN X, WU N, DAI J, et al. TXNIP mediates the differential responses of A549 cells to sodium butyrate and sodium 4-phenylbutyrate treatment[J]. Cancer Med, 2017, 6(2): 424-438.
- [10] KUSACZUK M, KRĘTOWSKI R, BARTOSZEWCZ M, et al. Phenylbutyrate—a pan-HDAC inhibitor—suppresses proliferation of glioblastoma LN-229 cell line[J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 931-942.
- [11] 孙象军. 苯丁酸钠和二甲基甲酰胺对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖抑制及同源盒基因 (HOX) A5 表达影响的比较[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(13): 2025-2027.
- [12] 孙象军, 王明春, 王巍. 苯丁酸钠对乳腺癌细胞超微结构的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(4): 560.
- [13] CHEN W, WEI F, XU J, et al. Trastuzumab enhances the anti-tumor effects of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate on a HER2-overexpressing breast cancer cell line[J]. Int J Mol Med, 2011, 28(6): 985-991.
- [14] 张娟, 孙洁, 欧阳涛, 等. 乳腺癌易感基因 1 和乳腺癌易感基因 2 阴性家族性乳腺癌患者的临床病理特征及与新辅助化疗疗效的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(3): 185-189.
- [15] 刘兆芸, 贺科文, 宋兴国, 等. 自噬抑制剂可增强三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 对吉非替尼的敏感性[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(6): 417-424.
- [16] 张勇, 杨越, 叶俊松, 等. 乳腺癌相关基因 BRCA1 与多西紫杉醇化疗敏感性研究[J]. 中华内分泌外科杂志, 2014, 8(5): 362-364.
- [17] 冯燕, 杨畅, 延文, 等. miR-185 通过靶向 BRCA1 抑制三阴乳腺癌细胞的增殖与侵袭[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(21): 5257-5260.
- [18] BARETTA Z, MOCELLIN S, GOLDIN E, et al. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(40): e4975. DOI: 10.1097/MD.0000000000004975.
- [19] VON MG, SCHNEEWEISS A, LOIBL S, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): 747-756.
- [20] 中国医师协会精准治疗委员会乳腺癌专业委员会, 中华医学会肿瘤学分会乳腺肿瘤学组, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国乳腺癌患者 BRCA1/2 基因检测与临床应用专家共识 (2018 年版)[J]. 中国癌症杂志, 2018, 28(10): 787-798.

(收稿日期: 2019-05-21, 修回日期: 2019-07-22)