

世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (Volume 12 Number 2)



2/2004

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,
《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.
世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2004 年 2 月 15 日

第 12 卷

第 2 期

(总第119期)

述 评

253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军

胃 癌

258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦

262 胃癌前病变p21^{ras}, c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤

266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青

肝 癌

271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达
邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南

276 肝癌细胞H₂₂与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究
张娟, 张锦堃, 卓少宏

280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达
周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊

283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林

病毒性肝炎

286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白
成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟

291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析
成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟

298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞

302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因
王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花

306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因
刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花

311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因
杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林

315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅

319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究
张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘 敏

323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究
李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮

327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较
成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳

332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明

基础研究

336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定
蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭

339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析
刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴 旻

344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖 冰, 薛 玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪

347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达
杨 玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安, 周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花, 胡伏莲, 董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲, 宋于刚, 覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球</p>
临床研究	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生</p>
焦点论坛	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花</p> <p>408 转录因子C/EBPb的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆荫英, 成军, 张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏, 成军, 张树林</p>
文献综述	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达, 王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静, 高毅, 钟世镇</p> <p>439 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳, 李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强, 谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇, 何生</p>
研究快报	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双, 李玉军, 田宇彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增, 张建中, 岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟, 张超</p>

临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
- 481 内镜下氩离子凝固术治疗胃息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
- 483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
- 485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
- 487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春
- 488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
- 490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
- 492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
- 494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申
- 497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
- 499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
- 501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
- 503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW
October 15-20, 2005
- American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting
October 28-November 2, 2005
- ISGCON 2005
November 11-15, 2005
isgcon2005@yahoo.co.in
www.isgcon2005.com
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course
November 18-19, 2005
www.asge.org/education
- II Latvian Gastroenterology Congress
November 29, 2005
gec@stradini.lv
www.gastroenterologs.lv
- 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases
December 1-3, 2005
c.chase@imedex.com
www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm
- 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus
February 22-25, 2006
isde@sapmea.asn.au
www.isde.net

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2004-02-15
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达

邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南

邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南, 中国人民解放军第四军医大学细胞工程研究中心 陕西省西安市 710032
邢金良, 男, 1972-09-22 生, 黑龙江省龙江县人, 汉族, 医学博士, 讲师, 第四军医大学细胞工程研究中心.
国家十五“863”计划课题, No.2001AA215101
国家自然科学基金资助课题, No.30200330
项目负责人: 陈志南, 710032, 陕西省西安市长乐西路 169 号, 中国人民解放军第四军医大学细胞工程研究中心. chcerc2@fmmu.edu.cn
电话: 029-3374547 传真: 029-3293906
收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-09-24

Construction of a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody and expression of chimeric Fab antibody against human hepatoma associated antigen HAb18G

Jin-Liang Xing, Xiang-Min Yang, Si-He Zhang, Xi-Ying Yao, Rui-An Liang, Zhi-Nan Chen

Jin-Liang Xing, Xiang-Min Yang, Si-He Zhang, Xi-Ying Yao, Rui-An Liang, Zhi-Nan Chen, Center for Cell Engineering Research, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by the National 863 Project of 10th Five-year Plan, No. 2001AA215101, and the National Natural Science Foundation of China, No.3020330
Correspondence to: Zhi-Nan Chen, Center for Cell Engineering Research, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. chcerc2@fmmu.edu.cn
Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-09-24

Abstract

AIM: To construct a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody and to use it for construction and expression of human-mouse chimeric Fab antibody against human hepatoma associated antigen HAb18G.

METHODS: Human IgG3 CH1 and C κ genes were amplified by PCR with specific primers and cloned into vector pComb3 to construct a human-mouse chimeric Fab antibody universal expression vector pComb3C. Then, the V κ and V μ genes of mAb HAb18 were amplified by PCR using specific primers and cloned into the expression vector pComb3-cFab. After gIII was cut away, the secretory expression vector pComb3C/cFab containing chimeric Fab antibody gene of HAb18 was constructed and transfected into competent *E. Coli*. And then, the antibody induction expression by IPTG was conducted. The localization of expression products was detected by sandwich ELISA. Finally, The expression product was purified by affinity chromatography and the antigen-binding specificity and affinity of the expression product were tested by ELISA and immunofluorescence staining.

RESULTS: Human IgG3 CH1 and C κ genes were correctly

inserted into vector pComb3 by nucleotide sequencing and restriction endonucleases digestion, with the size of 324bp and 333 bp, and chimeric Fab gene of mAb HAb18 was successfully constructed and expressed in *E. Coli*. The molecular mass of expression product was about 45 ku. It was mainly located in the periplasm. The results of ELISA and immunofluorescence staining showed that the expressed chimeric Fab contained human antibody fragment and had specific antigen-binding activity, and its affinity was about 10% of parental antibody HAb18.

CONCLUSION: We have successfully constructed a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody. Based on this result, a small molecule of chimeric Fab antibody against human hepatoma is prepared, which lays a foundation for its further application into diagnosis and therapy of human hepatocellular carcinoma.

Xing JL, Yang XM, Zhang SH, Yao XY, Liang RA, Chen ZN. Construction of a universal expression vector for human-mouse chimeric Fab antibody and expression of chimeric Fab antibody against human hepatoma associated antigen HAb18G. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):271-275

摘要

目的: 构建一个在大肠杆菌中表达人鼠嵌合Fab抗体的通用载体, 并用于抗人肝癌相关抗原 HAb18G 人鼠嵌合 Fab 抗体的表达。

方法: 利用特异引物 PCR 扩增人 IgG3 的 CH1 和 C κ 基因, 分别克隆到表达载体 pComb3 中, 从而构建成人 - 鼠嵌合 Fab 抗体的通用表达载体 pComb3C. 然后将扩增的 mAb HAb18 的 V μ 和 V κ 基因分别组装到通用表达载体中, 酶切去除 g III 片段后, 连接成为 HAb18 嵌合 Fab 抗体的分泌型表达载体 pComb3C/cFab. 转化大肠杆菌后诱导其表达, 通过 ELISA 检测产物的表达和定位. 最后, 利用亲和层析纯化表达产物, 进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测, 同时采用 ELISA 和免疫荧光法检测表达产物的亲和力和特异性。

结果: 测序及酶切鉴定表明, 人 IgG3 的 CH1 和 C κ 基因正确插入到 pComb3 中, 大小分别为 324 bp 和 333 bp, 同时 mAb HAb18 的嵌合 Fab 基因也分别获得正确组装和表达. 表达产物的分子质量约为 45 ku, 主要位于周质腔中. 另外, ELISA 和免疫荧光检测证实, 表达产物含有人的抗体片段, 并具有与相应抗原特异结合的活性, 亲和力约为亲本抗体的 10%。

结论: 成功构建了人鼠嵌合 Fab 抗体的通用表达载体并制备了抗人肝癌小分子嵌合 Fab 抗体, 为其进一步在肝癌诊断

与治疗中的应用奠定了基础。

邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南. 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(2):271-275

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/271.asp>

0 引言

HAbl8mAb 为抗人肝细胞肝癌表面分子 HAb18G/CD147 的特异性单克隆抗体^[1-2], 具有较好的特异性和亲和力. 近年来, 我们利用该 mAb 作为载体进行了肝癌的导向治疗研究, 其中 I¹³¹ 标记 HAb18 mAb 的 F(ab')₂ 制备的第二代肝癌放射免疫治疗剂已进入 II 期临床阶段^[3-7]. 但鼠源性抗体在患者体内可产生不同程度的人抗鼠抗体反应 (HAMA), 从而削弱其治疗的有效性, 并对清除抗体的器官产生毒性损害^[8]. 另外, 较大的抗体分子的组织穿透能力较差, 在血液和非瘤组织的清除较慢. 从而导致相对较低的 T/NT 比值, 因此应用受限^[9]. 为了克服这些弊病, 研制新一代低免疫原性高 T/NT 比值的基因工程抗体很有必要. 我们在成功制备 HAb18mAb 鼠源 Fab 抗体的基础上, 对已构建好的 Fab 抗体进行了部分人源化改造, 用 huCH1/huCL 替换鼠源的 mCH1/mCL, 制备成嵌合 Fab 片段, 以期尽可能的减少人体内应用时可能引发的人抗鼠抗体 (HAMA) 反应, 便于实际应用, 为进一步探讨该型抗体在肝癌治疗中的应用奠定了良好的基础.

1 材料和方法

1.1 材料 含有人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因的载体 pComb3/HuFab 由本校生化教研室温博士惠赠. 含有 mAb HAb18(IgG1)Fd 及全长轻链基因的 T 载体 pMD18T-Fd 和 pMD18T-L 由本中心构建并保存. 表达载体 pComb3 及 E.coli 感受态菌株 JM109 和 XL1-blue, 均为本室制备保存. T 载体、PCR 试剂及限制性内切酶和连接酶, 均为大连宝生物公司产品. mAb HAb18、嵌合 IgG 抗体 chHAbl8 及 HRP-HAb18 由本室自制. IPTG, FITC 及 HRP 标记的羊抗人 IgG 购于华美公司. Protein G 亲和层析柱为美国安玛西亚的产品. 肝癌细胞株 HHCC 由我中心培养保存. PCR 引物由北京赛百盛公司合成, 具体序列如下: MVHback5' - AAG TGA AGC TTC TCG AGT CTG G-5'; MVHfor5' - GGG GAT ATC TGC AGA GAC AGT GAC -3'; HuCH1back5' - GGG GCT CGA GTT GAT ATC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC -3'; HuCH1for5' - GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG -3'; MVLback5' - CAGATGTGAGCTCAGTA TTGTGATGACCCAGACTCC-3'; MVLfor5' - GGG GTC GAC GTT TTA TTT CCA ACT TTG T-3'; HuCLback5' - GTT CCG AGC TCA AGT CGA CCT GTG GCT GCA CCA TCT GTC -3'; HuCLfor3' - GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA GGC CC-3'. 划线处依次为 Xho I、EcoR

V、Xho I、EcoR V、Spe I、Sac I、Sal I、Sac I、Sal I 及 Xba I 的酶切位点.

1.2 方法

1.2.1 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建 以载体 pComb3/HuFab 为模板, 分别用两对引物扩增人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因. PCR 扩增产物经凝胶纯化试剂盒纯化并回收后, 分别与载体 pMD18-T 进行连接 (具体步骤参见试剂盒说明书), 构建成克隆载体 pMD18-T/HuCH1 和 pMD18-T/HuC κ , 并转化感受态大肠杆菌 JM109 挑选阳性克隆, 酶切鉴定后进行 DNA 序列分析. 以 Sac I+Xba I 分别双酶切表达载体 pComb3 和测序分析的克隆载体 pMD18-T/Hu C κ , 经琼脂糖凝胶电泳分离纯化目的片段后, 连接、转化, 筛选 pComb3/Hu C κ 阳性克隆并进行酶切鉴定. 然后, 用 Xho I+Spe I 双酶切构建的 pComb3/Hu C κ 和已测序分析的克隆载体 pMD18-T/Hu CH1, 重复连接、转化, 筛选及鉴定的步骤, 构建成嵌合 Fab 展示型通用载体 pComb3C.

1.2.2 HAb18 cFab 基因表达载体的构建 分别以载体 pMD18T-Fd 和 pMD18T-L 为模板, 利用对应的引物扩增 mAb HAb18 重、轻链可变区基因, 同时引入相应的酶切位点. 然后, 用 Sac I+Sal I 分别双酶切表达载体 pComb3C 和经凝胶纯化试剂盒纯化并回收后的 mAb HAb18 重链可变区基因 PCR 扩增产物, 经琼脂糖凝胶电泳分离纯化目的片段后, 连接、转化, 筛选 pComb3C/cL 阳性克隆并进行酶切鉴定. 进而, 用 Xho I+EcoR V 双酶切构建的 pComb3C/cL 和经凝胶纯化试剂盒纯化并回收后的 mAb HAb18 轻链可变区基因 PCR 扩增产物, 重复连接、转化, 筛选及鉴定的步骤, 构建成嵌合 Fab 展示型载体 pComb3C/cFab-gIII. 再以 Spe I+Nhe I 酶切已鉴定正确的重组子 pComb3C/cFab-gIII 中的 gIII 片段后, 直接用 T4 DNA 连接酶将其环化为分泌型的表达载体 pComb3C/cFab, 再次进行转化、筛选和酶切鉴定等步骤, 获得目的克隆.

1.2.3 cFab 的小量诱导表达及鉴定和检测 分别取鉴定正确的 pComb3/cFab 重组菌和 pComb3 空载体转化菌 1:100 分别接种于 10 mL 和 5 mL 新鲜 SB-Amp (100 mg/L) 液体培养基中, 250 r/min 37 °C 振荡培养至 A_{600nm} 为 0.6 左右. 取出 pComb3/Fab 重组菌 5 mL 不加 IPTG 诱导剂, 其余菌液分别加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 所有菌液均于 250 r/min 30 °C 培养 16 h. 将菌液 12 000 g 离心 2 min 收集菌体. 反复冻融后离心收集上清, 利用夹心 ELISA 检测 cFab 的表达, 设立嵌合 HAb18IgG 作为阳性对照, PBS 作为空白对照 (Yan ZY, et al. Jingbian Fenzishengwuxue Shiyen Zhinan Beijing: Science Press. 1998:415-417). 分别收集和制备诱导菌的培养基上清、周质腔提取液、细胞质蛋白和不溶性沉淀物, 夹心 ELISA 检测 cFab 表达产物的定位.

1.2.4 cFab 表达产物的纯化及鉴定和检测 同步骤 1.2.3 的条件诱导表达 500 mL pComb3/cFab 重组菌, 制备周

质腔提取液, 具体操作步骤参见文献[10]. 样品于 PBS 缓冲液中 4 °C 透析过夜后, 利用 protein G 亲和层析柱纯化, 具体纯化方法参见产品说明书. 纯化样品进行 120 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western Blot 分析. (1) 间接 ELISA: 包被 HAb18G^[11] (mAb HAb18 的相应抗原) 胞外区的原核融合表达产物 GST-HAb18GE 和粗纯化的 GST, 检测纯化 cFab 表达产物的抗原结合特异性, 以 chHAb18 为阳性对照, PBS 为空白对照. (2) 竞争性 ELISA: 以粗纯化的 GST-HAb18GE 4 °C 包被过夜, 用脱脂奶粉封闭后, 加入 HRP-HAb18 (0.1 mg/L) 与不同稀释度的 cFab 表达产物的等量混合物. 孵育洗涤后, 以 TMB 显色, 检测 A_{450nm} 值, 并计算抑制率和相对亲和力. 抑制率(%)=[(对照组 A 值 - 抑制组 A 值)/对照组 A 值] × 100%. (3) 免疫荧光染色 制备高表达 HAb18G 的 HHCC 细胞悬液, 调整细胞密度至 $5 \times 10^9/1 \times 10^{10}/L$. 用马血清稀释 HAb18 cFab 后, 将其加入到适量 HHCC 细胞悬液中, 4 °C 作用 30 min, 洗涤 2 次. 然后, 加入兔抗人 IgG-FITC, 4 °C 作用 30 min, 洗涤 2 次, 经固定、制片后, 于荧光显微镜下观察. 分别设立人 IgG 为阴性对照, PBS 为空白对照.

2 结果

2.1 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建 利用 PCR 成功扩增出与预期大小相符的人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因片段(图 1). 序列测定结果证实与已知的人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因序列完全相符, 大小分别为 324 bp 和 333 bp, 且同时正确引入了相应的酶切位点. 重组通用表达载体 pComb3C 酶切鉴定结果显示, 人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区基因已正确插入载体 pComb3 中相应的酶切位点, 为单拷贝插入(图 1).

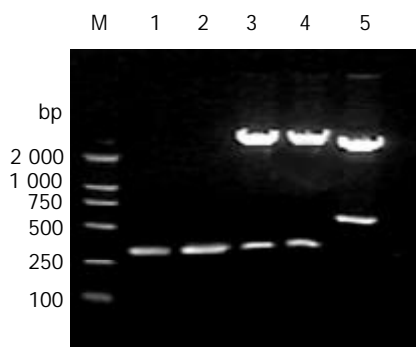


图1 重组通用表达载体 pComb3C 的限制性酶切分析. M: DNA marker; 1: Human IgG3CH1; 2: Constant region of human κ chain; 3: pComb3C/Xho I + Spe I; 4: pComb3C/Sac I + Xba I; 5: pComb3C/EcoR V + Sal I.

2.2 HAb18cFab 基因表达载体的构建 利用 PCR 成功扩增出与 mAb HAb18 重、轻链可变区基因预期大小相符的目的片段(图2). 酶切载体及相应基因片段后构建成重组表达载体 pComb3C/cFab(图3). 酶切鉴定结果(图2)证实, 目的基因片段已正确插入载体 pComb3C 中相应的

酶切位点. 序列分析结果显示, 嵌合 Fd 片段的 V_H 及嵌合轻链的 V_L 序列与已克隆的 HAb18 可变区序列完全相符, 并正确引入了相应的酶切位点, 同时鼠源的 V_H、V_L 分别与人 IgG3CH1 及 κ 轻链恒定区通过酶切位点 EcoR V、Sal I 获得正确组装, 且密码子读框正确.

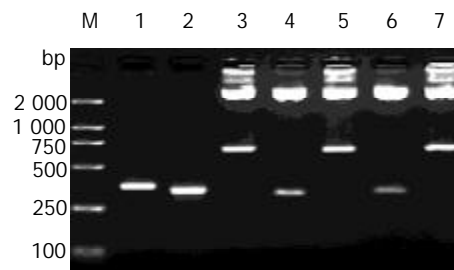


图2 重组 cFab 表达载体 pComb3C/cFab - gIII 的限制性酶切分析. M: DNA marker; 1: VH; 2: VL; 3: pComb3C/cFab - gIII/ Xho I + Spe I; 4: pComb3C/cFab - gIII/ EcoR V + Spe I; 5: pComb3C/cFab - gIII/Sac I + Xba I; 6: pComb3C/cFab - gIII/ Sal I + Xba I; 7: pComb3C/cFab - gIII/ Spe I + Nhe I.

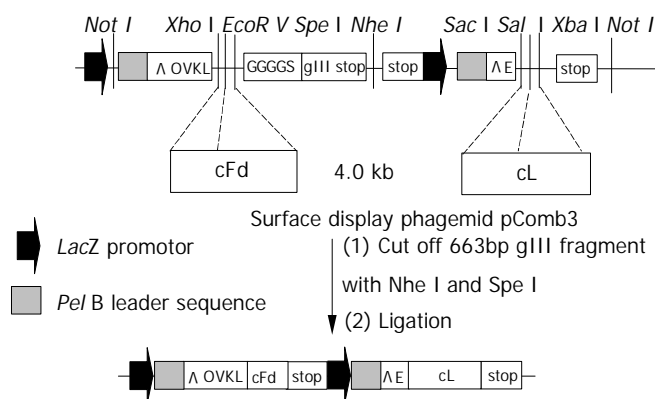


图3 cFab 基因表达载体的构建.

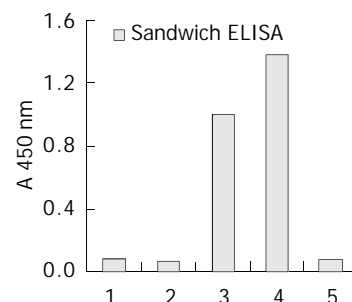


图4 夹心 ELISA 检测 cFab 的表达. 1: pComb3 after induction; 2: pComb3C/cFab before induction; 3: pComb3C/cFab after induction; 4: chHAb18; 5: PBS.

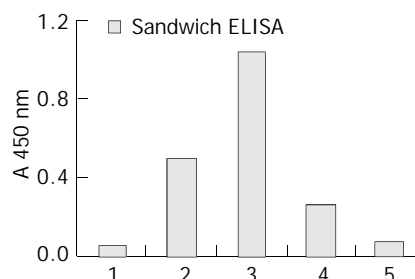


图5 夹心 ELISA 检测 cFab 抗体表达产物的定位. 1: PBS; 2: Media supernatant; 3: Periplasmic extracts; 4: Cytoplasmic extracts; 5: Precipitation.

2.3 cFab的诱导表达及鉴定 夹心ELISA检测证实: 重组载体 pComb3C/cFab 经 IPTG 诱导后成功的获得 cFab 抗体的表达(图 4, 图 5). cFab 表达产物主要存在于周质腔中, 培养基上清和细胞质中也有少量存在, 而沉淀中则未检测到 cFab 的存在.

2.4 cFab 表达产物的纯化和抗原结合活性的检测 利用亲和层析从 500 mL 培养细菌中纯化获得了 50 μ g cFab 表达产物. SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 检测表明, 非还原状态下目的蛋白分子质量约为 42 ku, 还原后改变为 25 ku 左右. 所有蛋白条带均与羊抗人 IgG 抗体特异结合(图 6). 间接 ELISA 显示, 纯化的 cFab 可与 HAb18G 胞外区片段特异性结合(图 7). 同时竞争性 ELISA 结果证实, 纯化的 cFab 可以与亲本鼠抗体竞争性结合同一抗原表位, 且竞争性作用随着抗体浓度的增加而增强(图 8). 根据 50% 抑制率时 cFab 抗体与亲本鼠抗体浓度的比值, 可估计出其亲和力约为亲本鼠抗体 HAb18 的 10%. 免疫荧光染色结果也表明, 纯化的 cFab 可与肝癌细胞株 HHCC 特异性结合(图 9A), 阴性对照的细胞未见荧光染色(图 9B).

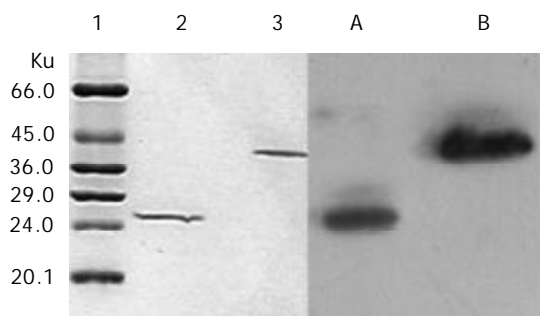


图 6 cFab 抗体表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 分析. 1: m_m marker; 2: Reduced cFab; 3: Unreduced cFab; A: Western blot of reduced cFab; B: Western blot of unreduced cFab.

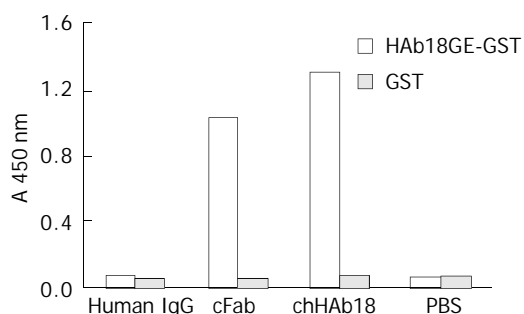


图 7 间接 ELISA 检测 cFab 抗体的抗原结合特异性.

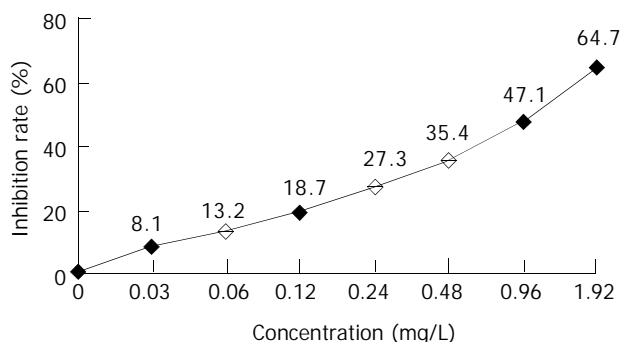


图 8 竞争性 ELISA 检测 cFab 与 HAb18 的相对抗原结合活性.

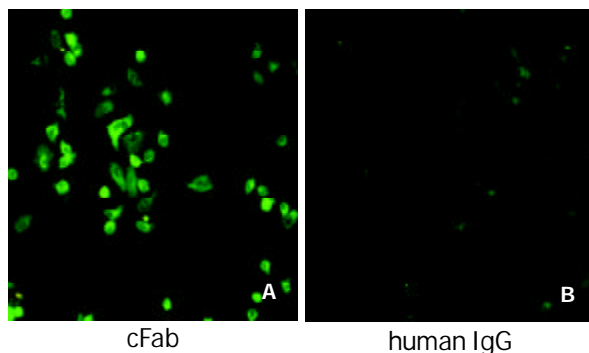


图 9 免疫荧光染色观察 cFab 与肝癌细胞株 HHCC 的结合($\times 200$).

3 讨论

单克隆抗体作为一种新型生物制剂在人类疾病的预防、诊断及治疗方面已显示出重要作用^[12-14]. 然而, 鼠源性单抗属于异种蛋白而具免疫原性, 故在人体内应用时可产生不同程度的人抗鼠抗体(HAMA)反应, 因此其应用受到限制. 制备嵌合抗体、人源化抗体甚至完全人源性抗体可以程度不同的克服上述问题^[15-16], 但由于完全人源性抗体和人源化抗体制备相对比较困难^[17], 所以目前嵌合抗体是最常用于降低免疫原性的方法之一^[18]. 嵌合抗体应用于临床治疗是安全有效的^[19].

另外, 全抗体分子组织穿透能力较差, 在血液和非瘤组织的清除较慢, 从而导致相对较低的 T/NT 比值. 嵌合 Fab 抗体的 M_r 为 50 Ku, 只有完整 IgG 的 1/3, 具有较好的穿透性和药代动力学特征, 且能较好地保持结合抗原的活性因而成为当今应用较多的一种基因工程抗体类型^[20-21]. cFab 由于没有 Fc 段, 从理论上减少了发生非特异性结合, 产生排斥反应的机会. 和完整抗体相比, cFab 没有抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)和补体依赖的细胞毒作用(CDC), 因而主要作为载体分子用于疾病的导向诊断和治疗, 也可以进一步加工改造用于制备基因工程嵌合 F(ab)₂ 的抗体形式^[22].

由于嵌合 Fab 不需要翻译后修饰, 所以目前应用最多的为原核表达系统^[23]. 所用 pComb3 该系统最为常见的噬粒表达载体之一, 含有两套启动子、前导肽及多克隆位点, 可同时使 cFd 和轻链基因在大肠杆菌中共表达. 表达产物在引导肽引导下, 可分泌进入大肠杆菌的周质腔, 在周质腔中形成二硫键并折叠成正确的空间构象, 并以有活性的可溶状态存在, 但也可由于未知的“渗漏”机制, 而导致 cFab 进入培养上清. 相对于以包涵体形式表达的蛋白而言, 分泌表达最大的优点是表达的抗体活性较高且便于纯化, 无须进行重新折叠复性等复杂的处理过程, 同时可避免细菌蛋白酶的降解, 降低抗体蛋白对宿主细胞的毒性作用, 但产量一般低于包涵体表达.

为了利于将各种鼠源性抗体方便的改造成嵌合 Fab 的形式, 避免每一次构建时均要进行嵌合 Fd 和嵌合轻链拼接的烦琐, 并尽量减少拼接部位个别氨基酸的改变对嵌合 Fab 抗体结构与功能活性的不确定影响, 我

们首先将人 IgG3CH1 和 κ 轻链恒定区基因克隆至原核分泌表达载体 pComb3 中, 成功构建了一个人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体 pComb3C, 从而使鼠源性 V_H 、 V_L 与人 IgGCH1、 κ 轻链恒定区基因拼接部位的氨基酸构成得以固定. 并通过抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达证实了拼接部位的氨基酸构成对片段抗体的活性无明显影响. 其次, 我们先后将 mAb HAb18 重、轻链可变区基因亚克隆到载体 pComb3C 中相应的内切酶位点, 然后用 Spe I 和 Nhe I 双酶切去除 gIII 基因而得到可溶性 cFab 的表达载体. ELISA 和免疫细胞化学检测均证实, cFab 获得表达, 并具有较好的亲和力和特异性, 但纯化的结果显示表达产物的分泌量较低. 原因可能有两个方面: 一是外源基因本身对产量的影响, 这在我们表达 HAb18 的鼠源性 Fab 抗体时也有体现. 二是可能表达的条件不够优化. 根据 Raffai et al^[24] 的报道, 在 Fab 的表达中, 选用不同的大肠杆菌菌株在表达量和表达抗体的活性上会有所不同. 因此, 如何提高 HAb18 cFab 的表达量, 仍是进一步需要解决的关键问题. 目前, 我们也正在尝试通过大肠杆菌非分泌性表达的形式来获得大量的高活性 cFab 抗体, 以期为进一步探讨该类抗体在肝癌治疗中的应用奠定良好的基础.

4 参考文献

- 1 陈志南, 边惠洁, 蒋建利. 肝癌单抗研究应用现状与展望. 华人消化杂志 1998;6:461-462
- 2 辜爱荣, 商澎, 李郁, 黄宝成, 朱平, 梅其炳, 陈志南. HAb18G/CD147 拮抗肽抗肝癌转移作用的体外实验. 世界华人消化杂志 2003;11:255-259
- 3 Lou C, Chen ZN, Bian HJ, Li J, Zhou SB. Pharmacokinetics of radioimmunotherapeutic agent of direct labeling mAb 188Re-HAb18. *World J Gastroenterol* 2002;8:69-73
- 4 Yang LJ, Sui YF, Chen ZN. Preparation and activity of conjugate of monoclonal antibody HAb18 against hepatoma F(ab')₂ fragment and staphylococcal enterotoxin A. *World J Gastroenterol* 2001;7:216-221
- 5 Bian HJ, Chen ZN, Deng JL. Direct technetium-99m labeling of anti-hepatoma monoclonal antibody fragment: a radioimmunoconjugate for hepatocellular carcinoma imaging. *World J Gastroenterol* 2000;6:348-352
- 6 Qiu K, Wang BC, Chen ZN, Fang P, Liu CG, Wan WX, Liu YF. 99mTc-labeled HAb18 McAb Fab fragment for radioimmunoimaging in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:117-1201
- 7 陈志南, 刘彦仿, 隋延仿. 肝癌单克隆抗体 HAb18 在人体肝癌导向诊断中的意义和应用. 中华肿瘤杂志 1992;14:9-12
- 8 Hasholzner U, Stieber P, Meier W, Lamerz R. Value of HAMA-determination in clinical practice-an overview. *Anticancer Res* 1997;17:3055-3058
- 9 Souriau C, Hudson PJ. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:305-318
- 10 He FT, Nie YZ, Chen BJ, Qiao TD, Fan DM, Li RF, Kang YS, Zhang Y. Expression and identification of recombinant soluble single-chain variable fragment of monoclonal antibody MC3. *World J Gastroenterol* 2002;8:258-262
- 11 邢金良, 陈志南, 米力, 李郁, 冯强. 高效表达肝癌相关抗原 HAb18G 的 CHO 细胞株的建立. 肿瘤 2001;21:4-7
- 12 Goldenberg DM. Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:281-296
- 13 Trail PA, King HD, Dubowchik GM. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:328-337
- 14 Milenic DE. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des* 2002;8:1749-1764
- 15 Chuntharapai A, Lai J, Huang X, Gibbs V, Kim KJ, Presta LG, Stewart TA. Characterization and humanization of a monoclonal antibody that neutralizes human leukocyte interferon: a candidate therapeutic for IDDM and SLE. *Cytokine* 2001;15:250-260
- 16 Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med* 2003;9:129-134
- 17 Caldas C, Coelho V, Kalil J, Moro AM, Maranhao AQ, Brigido MM. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. *Mol Immunol* 2003;39:941-952
- 18 Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:118-129
- 19 Linenberger ML, Maloney DG, Bernstein ID. Antibody-directed therapies for hematological malignancies. *Trends Mol Med* 2002;8:69-76
- 20 Hellstrom HR. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Circulation* 2003;107:E39-49
- 21 赖增祖, 熊冬生, 范冬梅, 彭辉, 许元富, 朱祯平, 杨纯正. 嵌合抗 CD20 抗体 Fab 片段在大肠杆菌中表达及活性鉴定. 中国免疫学杂志 2000;16:521-524
- 22 Humphreys DP, Vetterlein OM, Chapman AP, King DJ, Antoniw P, Sutters AJ, Reeks DG, Parton TA, King LM, Smith BJ, Lang V, Stephens PE. F(ab')₂ molecules made from *Escherichia coli* produced Fab' with hinge sequences conferring increased serum survival in an animal model. *J Immunol Methods* 1998;217:1-10
- 23 Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody fab fragment against hepatitis B surface antigen. *J Med Virol* 1999;58:338-345
- 24 Raffai R, Vukmirica J, Weisgraber KH, Rassart E, Innerarity TL, Milne R. Bacterial expression and purification of the Fab fragment of a monoclonal antibody specific for the low-density lipoprotein receptor-binding site of human apolipoprotein E. *Protein Expr Purif* 1999;16:84-90



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

