

# 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 <sup>ras</sup> , 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H <sub>22</sub> 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Ic-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肠息肉 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](mailto:isgcon2005@yahoo.co.in)  
[www.isgcon2005.com](http://www.isgcon2005.com)
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course  
November 18-19, 2005  
[www.asge.org/education](http://www.asge.org/education)
- II Latvian Gastroenterology Congress  
November 29, 2005  
[gec@stradini.lv](mailto:gec@stradini.lv)  
[www.gastroenterologs.lv](http://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](mailto:c.chase@imedex.com)  
[www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm](http://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](mailto:isde@sapmea.asn.au)  
[www.isde.net](http://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](mailto: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《医学文摘库/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](http://www.wjgnet.com)

# 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

田耕, 易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科  
湖北省武汉市 430030  
田耕, 男, 1971-03-18 生, 陕西省宝鸡市人, 汉族, 博士, 主治医师. 主要从事肝脏肿瘤的研究.  
项目负责人: 田耕, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科. geng\_tian707@hotmail.com  
电话: 027-83663402  
收稿日期: 2003-06-30 接受日期: 2003-10-07

## Construction and identification of the eukaryotic expression vector of murine AFP-CTLA4 fusion protein

Geng Tian, Ji-Lin Yi

Geng Tian, Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Geng Tian, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.  
geng\_tian707@hotmail.com  
Received: 2003-06-30 Accepted: 2003-10-07

## Abstract

**AIM:** To clone the murine  $\alpha$ -fetoprotein gene and to construct the eukaryotic expression vector of AFP-CTLA4 fusion protein.

**METHODS:** Total RNAs were extracted from Hepa1-6 cells, then the murine  $\alpha$ -fetoprotein gene was amplified by RT-PCR and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1. The extramembrane domain of mouse CTLA4 gene was amplified from plasmid pmCTLA4-Ig, followed by the addition of a linker using overlap PCR. The PCR product was subcloned into pmAFP and fused in frame with the AFP. The recombinant of vector was transformed into *E.coli* DH5 $\alpha$ , the positive clones were selected and the plasmid DNA was identified by restriction enzyme analysis and sequencing. After transient transfection of CHO-K1 cells with the recombinant of vector, Western blotting was used to detect the expression of fusion protein.

**RESULTS:** The 1.8 kb murine  $\alpha$ -fetoprotein gene was successfully cloned from the total RNA of Hepa1-6 cells. The result obtained from the restriction enzyme analysis showed that the extramembrane domain of mouse CTLA4 gene was successfully inserted into pmAFP. Result of sequencing ascertained that the orientation of the ligations and the reading frame were correct, and Western blotting indicated that the recombinant of vector could express murine AFP-CTLA4 fusion protein in CHO-K1 cells.

**CONCLUSION:** We successfully construct eukaryotic expression vector of AFP-CTLA4 fusion protein, which forms an important basis for the research of immunotherapy of

hepatocellular carcinoma with pmAFP-CTLA4.

Tian G, Yi JL. Construction and identification of the eukaryotic expression vector of murine AFP-CTLA4 fusion protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(2):283-285

## 摘要

**目的:** 克隆小鼠甲胎蛋白(mAFP)基因并构建小鼠甲胎蛋白-细胞毒性T淋巴细胞抗原4(mAFP-CTLA4)融合蛋白真核表达载体.

**方法:** 从Hepa1-6细胞中提取总RNA进行RT-PCR, 扩增出mAFP基因, 亚克隆于pcDNA3.1载体. PCR法从质粒pmCTLA4-Ig中克隆出mCTLA4膜外部分基因并通过重叠PCR法添加接头, 重组连接于pmAFP质粒中mAFP基因后, 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆酶切、测序鉴定. 用质粒瞬时转染CHO细胞, Western blot检测融合蛋白的表达.

**结果:** 利用RT-PCR从Hepa1-6细胞总RNA中成功克隆出1.8 kb的mAFP基因;重组阳性克隆经酶切鉴定证实连有接头的CTLA4膜外部分基因已正确插入pmAFP质粒中, 测序结果证实各片段连接方向及阅读框正确. 用质粒瞬时转染CHO细胞, Western blot检测到预计大小分子量蛋白的表达.

**结论:** mAFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建成功, 为进一步研究其在肝癌免疫治疗中的作用奠定了基础.

田耕, 易继林. 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(2):283-285

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/283.asp>

## 0 引言

甲胎蛋白(AFP)能诱导T细胞产生AFP特异性的CTL. 基于AFP的质粒DNA疫苗免疫及转染AFP基因的树突状细胞免疫均在小鼠体内诱导产生了AFP特异性的抗肝癌免疫应答. 但AFP的免疫原性较弱<sup>[1-4]</sup>. 细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4)与B7-1(CD80)和B7-2(CD86)有很强的结合力, 而B7分子主要表达于APC表面. CTLA4为同源二聚体, 其单体亦能与B7分子结合. 融合蛋白CTLA4-Ig已作为免疫抑制剂用在移植和自身免疫疾病动物模型上. 为了在小鼠肝癌模型上研究通过CTLA4与B7分子结合的途径将AFP靶向送达APC能否增强AFP的免疫原性. 我们构建了编码小鼠AFP和小鼠CTLA4膜外部分融合蛋白的真核表达载体.



## 1 材料和方法

**1.1 材料** 小鼠肝癌细胞系 Hepa 1-6 由第二军医大学王皓博士惠赠; E.coli. DH5 $\alpha$  菌种由华中科技大学同济医学院蔡俐琼硕士惠赠, 编码 mCTLA4-Ig 融合蛋白的质粒 pmCTLA4-Ig 由华中科技大学同济医学院汪道文教授惠赠, 真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His 购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒(Ver.2.1)、Ex Taq 高保真 Taq 酶、限制性内切酶和 T4DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; Trizol 试剂和 RPMI1640 为 Gibco 公司产品、胎牛血清为 Hyclone 公司产品; 质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶核酸纯化回收试剂盒为 Omega 公司产品. 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂.

**1.2 方法** 培养 Hepa 1-6 细胞至对数期, 收集细胞, 细胞数应在  $5-10 \times 10^6$ , 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA. 为了克隆包括分泌信号在内的 AFP 全长基因, 设计的引物为 P1、P2, P1: 5'-CTCAGGAATTCGCCATGAAGTGGATCACA-3', 在 5' 端引入酶切位点 Eco RI; P2: 5'-CTCTGCTCTAGATTACTCGAGAACGCCCAAGCATCACG-3', 在 3' 端引入酶切位点 Xho I 和 Xba I. 引物由上海博亚生物工程公司合成. 利用 RT-PCR 试剂盒反转录出 cDNA 第 1 链, 引物采用 Oligo dT, 条件为: 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min. 采用 Ex Taq 高保真 Taq 酶进行随后的 PCR. PCR 条件为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环, 末次 72 °C 延伸 5 min. 取 PCR 产物 3  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察 RT-PCR 结果. 为了构建 mAFP-mCTLA4 融合蛋白的表达载体, 我们采用重叠 PCR 的方法在 mCTLA4 膜外部分基因的上游添加了编码 GGGSGGGGS 多肽接头的片段, 同时在 mCTLA4 膜外部分基因的下游添加了终止编码. 方法如下: 以 pmCTLA4-Ig 为模板, 第 1 轮扩增 mCTLA4 膜外部分基因的上、下游引物分别为: 5'-TATGGCGGGGGCTCGATGGAAGCCATACAGGTG-3' 和 5'-CTCTCTCTCTAGATCAAGAATCCGGGCATGGT-3', 引物由北京赛百盛公司合成. PCR 条件为: 95 °C 预变性 5 min, 5 °C 40 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环, 末次 72 °C 延伸 10 min. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后作为第 2 轮 PCR 的模板. 第 2 轮 PCR 下游引物不变, 上游引物改为 5'-TTATATTCTCGAGGAGGCGGGGGCTCGGGAGGCGGGGGCTCGATGG-3'. 第 1 轮上游引物的 5' 端与第 2 轮上游引物的 3' 端有 17 个核苷酸重叠. PCR 条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 40 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环, 末次 72 °C 延伸 10 min.

**1.2.1 重组质粒的构建、酶切和测序** 克隆的小鼠 AFP 基因经 Eco RI 和 Xba I 同时双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳回收、纯化; 质粒 pcDNA3.1/myc-His 同样经 Eco RI 和 Xba I 同时双酶切后, 回收纯化. 目的基因与质粒按 3:1 的比例混合, 加入 T4DNA 连接酶进行连接反应(18 °C, 16 h). 构建的质粒命名为 pmAFP. 按同样方法将加有接头的

mCTLA4 膜外部分基因与 pmAFP 分别经 Xho I 和 Xba I 双酶切后进行连接, 即将连有接头的 mCTLA4 膜外部分基因的 N 端与 pmAFP 中编码 mAFP 基因的 C 端相连, 构建表达 mAFP-CTLA4 融合蛋白的质粒, 命名为 pmAFP-CTLA4(图 1). 将上述连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂平板, 氨苄青霉素筛选阳性菌落. 挑取单个菌落培养, 小量质粒制备. pmAFP-CTLA4 用 Eco RI、Xba I 和 Xho I 进行单酶切或不同组合双酶切鉴定. 酶切鉴定正确的质粒, 挑取相应菌落培养后送上海博亚生物工程公司进行双向全长测序.

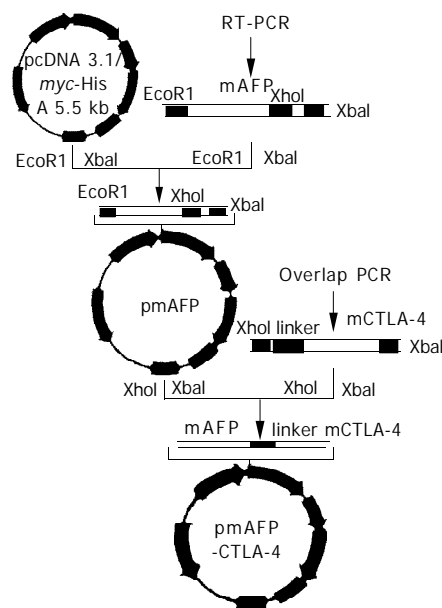


图1 真核表达载体 pmAFP-CTLA4 的构建过程.

**1.2.2 瞬时转染及 Western Blot 检测蛋白表达** 利用脂质体 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 瞬时转染 CHO 细胞, 按说明书进行操作. 在 6 孔板中每孔加入  $5 \times 10^5$  个 CHO 细胞, 24 h 后加入分别稀释于 Opti-MEM 培养基(Invitrogen) 质粒 4  $\mu$ g 和 lipofectamine 200 0.10  $\mu$ L, 48 h 后提取蛋白. 超声破碎仪粉碎 Hepa 1-6 细胞, 提取蛋白质作为阳性对照. 蛋白质经电泳后, 半干法转印至硝酸纤维素膜上, 一抗分别为羊抗人 AFP 多克隆抗体和生物素标记的兔抗小鼠 CTLA4 多克隆抗体, 然后分别用 HRP 标记的抗羊二抗及 HRP 标记的亲合素孵育, ECL(Pharmacia) 显色.

## 2 结果

提取的总 RNA A260/A280 比值为 1.885, 表明总 RNA 较纯. 以 Oligo dT 反转录的 cDNA 为模板, 用设计引物进行 PCR 扩增, 所得特异性条带与预期长度为 1.8 kb 的目的基因相符(图 2). 以 pmCTLA4-Ig 为模板, 第 1 轮 PCR 扩增 mCTLA4 膜外部分基因得到预期长度的目的基因. 以第 1 轮 PCR 产物为模板行重叠 PCR 得到加有接头的 mCTLA4 膜外部分基因, 共 414 个碱基.

**2.1 重组质粒酶切及测序鉴定** 质粒带有相应的目的基因. 对重组质粒进行测序, 结果与实验设计完全相符,

连接方向及阅读框正确, 说明本实验已成功构建编码小鼠 AFP 和小鼠 CTLA4 膜外部分的融合蛋白的质粒(图 3).

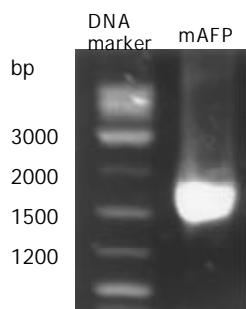


图2 RT-PCR 获得小鼠 AFP 基因.

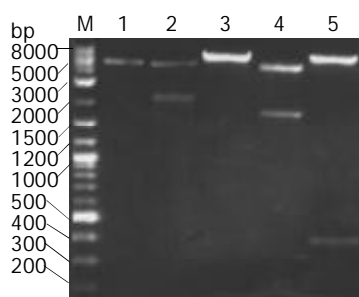


图3 重组质粒 pmAFP-CTLA4 酶切鉴定. M: DNA marker (200 bp-10 kb); 1: pcDNA3.1 (Eco RI); 2: pmAFP-CTLA4 (Eco RI + Xba I); 3: pmAFP-CTLA4 (Eco RI); 4: pmAFP-CTLA4 (Eco RI+Xho I); 5: pmAFP-CTLA4 (Xho I+Xba I).

**2.2 Western Blot 检测蛋白表达** 分别用 pmAFP 和 pmAFP-CTLA4 瞬时转染 CHO 细胞. Western blot 检测蛋白表达(图 4), 一抗分别为抗 -AFP 抗体(图 4 A)和抗 -CTLA4 抗体(图 4 B). 结果显示上述两种质粒可分别表达分子质量为 70 和 84 ku 的蛋白质.

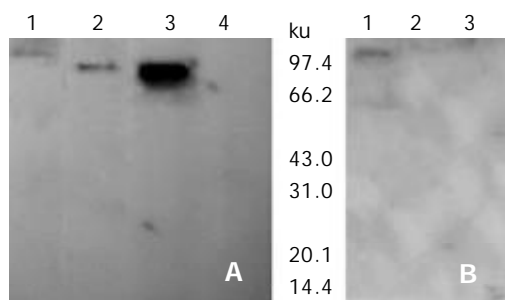


图4 Western Blot 检测蛋白表达. A: 1: CHO/pmAFP-CTLA; 2: CHO/pmAFP; 3: Hepa 1-6; 4: CHO/ pcDNA3.1; B: 1:CHO/pmAFP-CTLA; 2: CHO/pmAFP; 3: CHO/pcDNA3.1.

### 3 讨论

AFP 作为肝癌的标志物已被广泛用于临床<sup>[3-15]</sup>. 近年来的

研究说明 AFP 能够作为肝癌免疫治疗的靶的<sup>[1-4]</sup>, 解决了肝癌免疫治疗的第一个障碍 - 靶的问题. 但是 AFP 免疫原性较弱, 所诱导的抗肝癌免疫力不强<sup>[2-4]</sup>. 已有研究发现, 通过基因工程的方法将 mCTLA4 与自身肿瘤抗原融合, 利用 mCTLA4 和 B7 分子的相互作用将抗原直接靶向抗原提呈细胞(APC)能显著提高抗体和 T 细胞免疫应答<sup>[16]</sup>, 还能诱导产生明显的抗肿瘤免疫<sup>[16]</sup>. 在本实验中, 我们用 PCR 法克隆出 mCTLA4 膜外部分基因并通过重叠 PCR 法添加接头(添加接头的 mCTLA4 膜外部分共 414 个碱基), 并构建了编码小鼠 AFP 和小鼠 CTLA4 膜外部分的融合蛋白的质粒 pmAFP-CTLA4, 为探讨该质粒在肝癌免疫治疗中的作用奠定了基础.

### 4 参考文献

- Butterfield LH, Meng WS, Koh A, Vollmer CM, Ribas A, Disette VB, Faull K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T cell responses to HLA-A 0201-restricted peptides derived from  $\alpha$ -fetoprotein. *J Immunol* 2001;166:5300-5308
- Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, Sauerbruch T, Caselmann WH. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* 2002;9:346-355
- Meng WS, Butterfield LH, Ribas A, Disette VB, Heller JB, Miranda GA, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS.  $\alpha$ -feto-protein-specific tumor immunity induced by plasmid prime-adenovirus boost genetic vaccination. *Cancer Res* 2001;61:8782-8786
- Grimm CF, Ortman D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse  $\alpha$ -feto-protein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000;119:1104-1112
- Tang ZY. Clinical research of hepatocellular carcinoma in the 21st century. *China Natl J New Gastroenterol* 1995;1:2-3
- Wang JH, Lin G, Yan ZP, Wang XL, Cheng JM, Li MQ. Stage II surgical resection of hepatocellular carcinoma after TAE: a report of 38 cases. *World J Gastroenterol* 1998;4:133-136
- Wu MC. Clinical research advances in primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 1998;4:471-474
- Wu ZQ, Fan J, Qiu SJ, Zhou J, Tang ZY. The value of postoperative hepatic regional chemotherapy in prevention of recurrence after radical resection of primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:131-133
- 张开泰, 韩本立, 王玉芝. 肝细胞性肝癌 AFP-mRNA 检测外周血癌细胞的价值. *华人消化杂志* 1998;6:689-691
- 周信达. 肝癌复发转移防治的研究进展. *世界华人消化杂志* 1999;7:260-261
- 杨秉辉, 任正刚, 汤钊猷. 原发性肝癌临床分期之推荐意见. *世界华人消化杂志* 2000;8:441-442
- 王在国. 肝癌的综合治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:443-445
- 李锦清. 肝癌术后复发高危病例的预测和防治. *世界华人消化杂志* 2000;8:445
- 田伏洲. 肝癌肿瘤标记物. *世界华人消化杂志* 2000;8:440-441
- 赵海磊, 刘成, 赵爱光. 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化. *世界华人消化杂志* 2003;11:1345-1348
- Huang TH, Wu PY, Lee CN, Huang HI, Hsieh SL, Kung J, Tao MH. Enhanced antitumor immunity by fusion of CTLA4 to a self tumor antigen. *Blood* 2000;96:3663-3670



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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

