

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738 (2014) 08 - 0844 - 04

## 河南华溪蟹金属硫蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

何永吉, 刘进平, 王 兰\* (山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006)

**[摘要]** 目的 制备小鼠抗河南华溪蟹金属硫蛋白(MT)单克隆抗体(mAb),并鉴定其免疫学特性。方法 分别利用小泛素样修饰蛋白(SUMO)融合表达系统和碱性磷酸酶(phoA)分泌表达载体制备河南华溪蟹重组蛋白SUMO-MT和His-MT,以SUMO-MT为免疫抗原、His-MT为检测抗原,利用杂交瘤技术建立抗河南华溪蟹MT mAb杂交瘤细胞株。采用间接ELISA测定mAb腹水效价,Western blot法、Dot-ELISA分析mAb的特异性。结果 成功建立了2株稳定分泌抗MT蛋白的mAb杂交瘤细胞株,分别命名为mAb-MT2和mAb-MT3,均属于IgG1亚类。腹水效价分别为1:500 000、1:1000 000,Western blot和Dot-ELISA结果证实2株mAb均能特异性识别重组MT和内源性MT。结论 成功制备了具有较高特异性的河南华溪蟹MT mAb。

**[关键词]** 河南华溪蟹;金属硫蛋白;单克隆抗体

**[中图分类号]** Q813.2, R392.11 **[文献标志码]** A

DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.006980

## Preparation and characterization of monoclonal antibodies against metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*)

HE Yongji, LIU Jinping, WANG Lan\*

School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare a monoclonal antibody (mAb) against metallothionein (MT) of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) and characterize its immunologic properties. **Methods** Two recombinant MT of *S. henanense*, namely SUMO-MT and His-MT, were produced by SUMO fusion system and phoA secretion expression system in *E. coli*. SUMO-MT was used as an antigen to immunize BALB/c mice. By means of the cell fusion technique, multiple cell subcloning, repeated screening with His-MT as detecting antigen, the hybridomas specifically secreting mouse mAb against the MT of *S. henanense* were generated. The titers of mAbs were measured by indirect ELISA and the specificity of the mAbs was evaluated by Western blotting and Dot-ELISA. **Results** Two hybridoma cell lines designated mAb-MT2 and mAb-MT3 with the property of secreting mAb against the MT continuously and steadily were successfully obtained. Their immunoglobulin subclass was IgG1. The titers of the ascites fluid were 1:500 000 and 1:1000 000, respectively. Western blot analysis confirmed that the two mAbs both reacted with recombinant SUMO-MT and His-MT with good sensitivity. The Dot-ELISA demonstrated that the two mAbs reacted specifically not only with recombinant MT but also natural MT. **Conclusion** The mAbs against MT of *S. henanense* with high specificity were successfully prepared.

**[Key words]** *Sinopotamon henanense*; metallothionein; monoclonal antibody

金属硫蛋白(metallothionein, MT)于1957年由哈佛大学的Margoshes和Vallee在研究马肾脏蓄积镉的过程中首次发现并分离,是一类低分子量( $M_r$ )、富含半胱氨酸、不含芳香族氨基酸和组氨酸、能被多种金属诱导并结合多个金属原子的非酶类蛋白质<sup>[1]</sup>。MT普遍存在于生物界中,在生物体内其所有的半胱氨酸均处于还原状态,具有清除体内自由基、解除重金属毒性、增强机体对各种不良适应能力等功能<sup>[2]</sup>。

特别是作为一种重要的重金属解毒蛋白,体内唯一能有效解离、解毒重金属的一种生物途径,MT成为重金属污染监测和治理的研究热点<sup>[3]</sup>。重金属进入机体可特异性诱导MT的高水平表达,进而螯合一定的重金属形成重金属-MT复合物,或者夺取与其他功能蛋白结合的重金属离子来降低功能蛋白的损伤,减少重金属对组织的损害<sup>[4]</sup>。由于水生生物体内的MT与水环境和体内组织中重金属之间显著的相关

收稿日期: 2013 - 10 - 29; 接受日期: 2014 - 05 - 19

基金项目: 国家自然科学基金(30970361); 高等学校博士学科点专项科研基金(20111401110010); 山西省自然科学基金(2010011043-2)

作者简介: 何永吉(1980-),男,山西晋中人,助理研究员,博士研究生

Tel: 13934544912; E-mail: heyongji\_919@163.com

\* Corresponding author, 王 兰, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

性, 因而生物组织中的 MT 含量可以作为水环境监测重金属暴露的一个分子生态毒理学指标, 为确定水环境污染程度提供客观和全面的指标<sup>[5]</sup>。现阶段 MT 含量的测定方法主要有金属结合法、电化学法、色谱分析法等, 因 MT 蛋白的特殊性, 上述测定方法无一不受 MT 结合金属种类、MT 同形体多态性等因素的影响而对结果产生偏差<sup>[6]</sup>。受制于 MT 定量测定方法的限制, MT 在环境监测中的应用尚未进一步开发。目前许多学者通过制备特异性抗体建立免疫学检测方法定量检测 MT, 相关报道主要集中在鱼类和贻贝、牡蛎等海洋动物中, 且主要通过制备多克隆抗体来实现<sup>[7]</sup>。而与淡水蟹类的相关研究, 特别是 MT 单克隆抗体 (monoclonal antibodies, mAb) 制备尚未见报道。

河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*), 由海洋蟹多元转化而成, 终身栖息于淡水中, 属于甲壳纲、十足目中一个特殊分支。作为生活于水体底层的低等生物, 溪蟹直接面对沉积在水体的金属离子, 是一种理想的水环境监测指示生物<sup>[8]</sup>。本研究在原核表达纯化重组河南华溪蟹 MT 的基础上, 制备其 mAb, 为深入研究 MT 的生物学功能以及建立快速、敏感的新型免疫学检测方法奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 重组工程菌 PET-28a-SUMO-MT/BL21 (DE3)、phoA-MT/BL21 (DE3) 由本实验室构建、保存。健康雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; Quick Antibody-Mouse5W 免疫佐剂<sup>[9]</sup>购自北京康碧泉生物技术有限公司; PEG1500 购自 Roche 公司; HT、HAT、ITS 合剂、青-链霉素、胰岛素、L-谷氨酰胺、抗体亚类鉴定试剂盒均购自 Sigma 公司; NCTC-109 培养基购自 Gibco 公司; DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司;  $\beta$ -巯基乙醇购自北京索莱宝科技有限公司; PVDF 膜、NC 膜购自 Bio-Rad 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 GeneTex 公司; 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 邻苯二胺 (o-phenylenediamine, OPD) 和 NBT/BCIP 显色剂购自 Amresco 公司; 其余常规试剂均为国产分析纯。HGPRT 缺陷型小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0 购自中国典型培养物保藏中心, 融合前经 8-氮鸟嘌呤筛选 2 周。

### 1.2 方法

**1.2.1 抗原的制备** 免疫用抗原小泛素样修饰蛋白-金属硫蛋白 (small ubiquitin-like modifier-metallothionein, SUMO-MT) 的制备: 重组工程菌 PET-28a-SUMO-MT/BL21 (DE3) 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达可溶性重组融合蛋白 SUMO-MT, 利用 Ni 离子螯合柱分离纯化后超滤浓缩交换至 pH7.8、0.01 mol/L Tris-HCl 储存液, 操作步骤依据文献方法进行<sup>[9]</sup>。检测用抗原 His-MT 的制备: MT 基因片段与质粒 phoA 通过

*Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切位点进行连接, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 构建重组工程菌 phoA-MT/BL21 (DE3), 经低磷酸盐诱导后分泌表达可溶性重组蛋白 His-MT, 同样经 Ni 离子螯合柱分离纯化, 超滤浓缩交换至储存液保存。

**1.2.2 动物免疫** 选择 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 取纯化后的重组 SUMO-MT 蛋白免疫小鼠。初次免疫用免疫抗原 SUMO-MT 与等体积 Quick Antibody-Mouse5W 水溶性免疫佐剂<sup>[9]</sup>迅速混合后, 于小鼠后腿小腿肌肉注射免疫, 每只小鼠注射 100  $\mu$ L, 免疫剂量为 25  $\mu$ g。免疫前尾部静脉取血作为阴性对照。3 周后按照同样的方式加强免疫 1 针。5 周后, 采微量尾血进行间接 ELISA 检测。当血清滴度达到要求后, 融合前 3 d 加倍剂量与等体积生理盐水混匀, 腹腔注射冲击免疫。融合前, 小鼠摘除眼球取血, 并分离血清作为阳性对照。

**1.2.3 细胞融合** 将免疫小鼠脾细胞悬液和生长状态良好的 Sp2/0 细胞以 10:1 的比例在 PEG1500 作用下进行融合, 融合前 PEG1500 于 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h。加入含 HT 筛选培养基 (含 50 mL/L DMEM/F12 培养基、10 mL/L NCTC-109 培养基、20 mL/L 胎牛血清和 1 mL/L ITS 合剂), 接种于 96 孔培养板中, 1  $\times$  10<sup>6</sup>/mL, 100  $\mu$ L/孔。37 $^{\circ}$ C、80 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 1 d 后, 换成含 HAT 筛选培养基培养。7~14 d 后改用含 HT 筛选培养基培养, 14 d 后换用普通培养基培养。

**1.2.4 杂交瘤细胞筛选与克隆** 根据 Kim 等<sup>[10]</sup>建立的间接 ELISA 筛选分泌抗 MT mAb 的杂交瘤细胞株。选取 96 孔酶标板, 每孔用碳酸盐缓冲液 (0.5 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6) 包被重组 His-MT (10  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/孔), 以 1:1 000 的免疫小鼠血清为阳性对照, 1:1 000 的未免疫正常 BALB/c 小鼠为阴性对照, 1:5 000 稀释的山羊抗小鼠 IgG-HRP 为二抗; 以邻苯二胺 (OPD) 溶液为反应底物, 492 nm 处酶标仪测定各孔 A 值, 以 P/N  $\geq$  2.1 时判定为阳性。同时用含 His-tag 的重组 IGF 蛋白包被做交叉筛选。采用有限稀释法对连续 3 次检测为阳性的细胞株进行亚克隆, 即调整细胞数至每毫升 10 个, 100  $\mu$ L/孔铺 96 孔细胞培养板, 亚克隆培养 10 d 后检测上清。重复进行 3 次亚克隆, 至 100% 杂交瘤细胞上清液均呈阳性时为建株标准。

**1.2.5 抗 MT mAb 亚类鉴定** 处于对数生长期、生长旺盛的杂交瘤细胞, 更换培养于未添加胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 继续培养 2~3 d 后收集细胞培养上清, 按照抗体亚类鉴定试剂盒操作说明进行亚类鉴定。

**1.2.6 mAb 腹水制备及纯化** 以液体石蜡作为致敏剂, 选取 22 周龄经产 BALB/c 小鼠, 以 0.5 mL/只注射液体石蜡。将筛选获得的杂交瘤细胞株扩大培养后, 以 1  $\times$  10<sup>5</sup>/mL ~ 1  $\times$  10<sup>7</sup>/mL 的细胞数接种杂交瘤细胞株至小鼠腹腔内生产腹水。10~12 d 后收集腹水, 3 000 r/min 离心 15 min, 收获上清。间接 ELISA 测定腹水效价。收获的腹水上清, 采用疏水性电荷诱导层析 (hydrophobic charge induction chromatography, HCIC) 和蛋白 A 亲和层析相结合的方法纯化腹水, 操作步骤依据文献 [11] 方法进行。纯化的样品经 120 g/L SDS-PAGE 分析其纯度。

**1.2.7 Western blot 法和 Dot-ELISA 鉴定** 重组 SUMO-MT 和

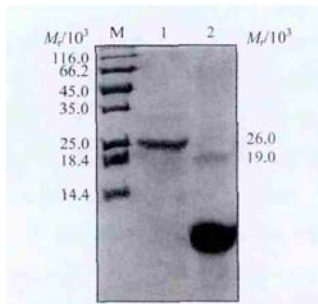
重组 His-MT 行 150 g/L SDS-PAGE 后, 电转印至 PVDF 膜上; 用含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST 封闭过夜, PBST 洗膜 4 次, 10 min/次, 加入 1:2 000 稀释的 mAb 作为一抗, 4℃ 过夜; PBST 洗膜 4 次后, 加入 1:5 000 稀释的 AP 标记的山羊抗小鼠 IgG, 室温反应 2 h; 用 PBST 洗膜 4 次后, 最后用 BCIP/NBT 显色试剂盒避光显色并拍照。按照本实验建立的方法制备河南华溪蟹肝胰腺组织 MT 粗提液<sup>[12]</sup>。分别取经 IPTG 和低磷酸盐诱导的 PET-28a-SUMO-MT/BL21 (DE3)、phoA-MT/BL21 (DE3) 裂解液上清、重组 SUMO-MT、重组 His-MT、重组 His-IGF 及河南华溪蟹肝胰腺组织 MT 粗提液各 5 ~ 10 μL 点样于 NC 膜上, 37℃, 30 min 干燥后, 用含 10 g/L BSA 的 PBS 封闭液振荡封闭 30 min。PBST 洗涤后, 加入所获的 mAb, 37℃ 振荡孵育 30 min; PBST 充分洗涤后, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:5 000 稀释), 37℃ 振荡孵育 30 min; 充分洗涤、滤纸吸干后, DAB 显色分析。

1.2.8 mAb 抗原识别位点分析 按照文献方法<sup>[13]</sup>, 利用 ELISA 叠加试验对 2 株 mAb 的抗原识别位点进行分析检测。利用间接 ELISA 测定 mAb-MT2 和 mAb-MT3 2 株 mAb 饱和值。按照上述建立的 ELISA, 一抗分别为饱和浓度 mAb-MT2、饱和浓度 mAb-MT3、饱和浓度 mAb-MT2 联合饱和浓度 mAb-MT3、饱和浓度 mAb-MT3 联合饱和浓度 mAb-MT2, 测定  $A_{492nm}$  值, 计算增殖指数 (AI)。按如下公式计算:  $AI = (A_{1+2} - A_1) / A_2 \times 100\%$ 。式中:  $A_1$  为 mAb-MT2  $A_{492}$  值;  $A_2$  为 mAb-MT3 的  $A_{492}$  值;  $A_{1+2}$  为 mAb-MT2 叠加 mAb-MT3 的  $A_{492}$  值。AI < 10% 为针对同一抗原位点, AI ≥ 10% 为针对不同抗原位点。

## 2 结果

### 2.1 SUMO-MT 和 His-MT 重组蛋白的表达和纯化

重组工程菌 PET-28a-SUMO-MT/BL21 (DE3)、phoA-MT/BL21 (DE3) 分别经 1 mmol/L IPTG 和低磷酸盐诱导后, 重组可溶表达重组蛋白 SUMO-MT 和 His-MT, 利用 Ni 离子螯合柱分离纯化目的蛋白。SDS-PAGE 结果显示 SUMO-MT 和 His-MT 相对分子质量 ( $M_r$ ) 分别为 26 000 (SUMO 标签  $M_r$  19 000, MT  $M_r$  7 000) 和 7 000 左右, 且蛋白纯度较高 (图 1)。



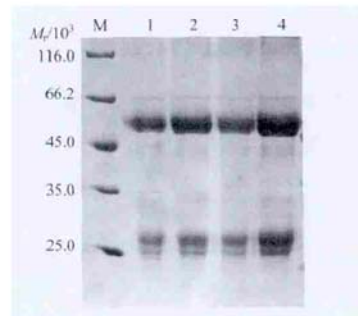
M: 蛋白  $M_r$  marker; 1: SUMO-MT 纯化样品; 2: His-MT 纯化样品。

图 1 SDS-PAGE 分析 SUMO-MT 和 His-MT 纯化样品

2.2 抗 MT mAb 杂交瘤细胞株的筛选 选择免疫后血清抗体效价较高的小鼠进行细胞融合。将状态良好的 Sp2/0 骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞融合, 融合率达 99%。融合后 10 d 左右, 待细胞长至孔底的 1/2 以上时, 取细胞上清采用间接 ELISA 进行交叉筛选。仅选择与 His-MT 蛋白反应为阳性, 而与含 His-tag 的 IGF 蛋白反应为阴性的克隆, 判定为阳性克隆。经初筛、复测, 3 次亚克隆培养后, 最终筛选获得 2 株能稳定分泌抗华溪蟹 MT 抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 mAb-MT2 和 mAb-MT3, 冻存、保种。

2.3 IgG 亚类鉴定 按照试剂盒说明操作, 2 株杂交瘤细胞株的 DMEM/F12 培养基无血清培养上清经夹心 ELISA 亚类鉴定为 IgG1 亚型。

2.4 腹水制备及效价测定 将杂交瘤细胞接种于经产 BALB/c 小鼠腹腔, 12 d 左右收集腹水。间接 ELISA 测定 mAb-MT2 和 mAb-MT3 腹水效价分别为 1:500 000、1:1000 000。腹水经 HCIC 和蛋白 A 亲和层析纯化后, 得到纯度较高的抗 MT mAb (图 2)。

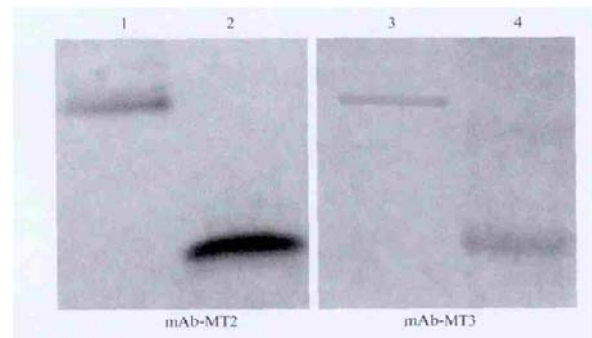


M: 蛋白  $M_r$  marker; 1、2: mAb-MT2 纯化样品; 3、4: mAb-MT3 纯化样品。

图 2 SDS-PAGE 分析 mAb-MT2 和 mAb-MT3 腹水纯化样

### 2.5 Western blot 鉴定

以纯化的 mAb 为一抗, AP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行 Western blot 分析鉴定。结果显示, 2 株杂交瘤分泌的 mAb 均能特异性识别重组 SUMO-MT 和 His-MT (图 3)。



1、3: SUMO-MT 纯化样品; 2、4: His-MT 纯化样品。

图 3 Western blot 鉴定

## 2.6 Dot-ELISA 检测抗 MT mAb 的特异性

Dot-ELISA 分析结果表明, 2 株 mAb 均能与重组菌 PET-28a-SUMO-MT/BL21 (DE3)、phoA-MT/BL21 (DE3)、重组 SUMO-MT、重组 His-MT 及肝胰腺组织 MT 粗提液反应, 具有良好的反应特异性, 而与重组 His-IGF、PET-28a-SUMO/BL21 (DE3) 没有特异反应性(表 1)。

表 1 MT mAb 的 Dot-ELISA 检测结果

样品	mAb-MT2	mAb-MT3
重组 SUMO-MT	++	++
重组 His-MT	++	++
重组 His-IGF	-	-
肝胰腺组织 MT 粗提液	++	++
PET-28a-SUMO-MT/BL21 (DE3)	++	++
PET-28a-SUMO/BL21 (DE3)	-	-
phoA-MT/BL21 (DE3)	++	++

阴性反应(-); 阳性反应(+).

**2.7 mAb 识别的抗原位点分析** 利用 ELISA 叠加法分析了 2 株 mAb 的抗原识别位点, 结果显示: mAb-MT2 和 mAb-MT3 叠加后, 增殖指数(AI)为 6%, 小于 10%, 说明 mAb-MT2 和 mAb-MT3 可能识别同一表位(表 2)。

表 2 MT mAb 抗原识别位点分析结果

一抗	饱和浓度	A <sub>492</sub> 值	增值指数 AI
mAb-MT2	1:3 200	1.08	/
mAb-MT3	1:3 200	1.12	/
mAb-MT2 联合饱和浓度 mAb-MT3	/	1.15	6%

## 3 讨论

MT 由于分子质量较小, 半衰期短, 在大肠杆菌体内不稳定且易被酶降解; 富含半胱氨酸, 极易形成无生物活性的包涵体和影响宿主体内的氧化还原环境; 易结合金属离子影响宿主细胞的正常生理代谢、对细胞的毒性以及细胞对金属离子的耐受性差等问题, 成为一种较难获得重组表达的蛋白<sup>[14]</sup>。在前期研究中, 将河南华溪蟹 MT 基因亚克隆至 PET-28a、PQE30 等一系列常规表达载体上, 发现其无法正常表达, 这也进一步验证了 MT 由于其独特的性质而较难获得重组表达的推理。为解决这一问题, 研究者多利用融合技术将 MT 基因与具有协助蛋白正确折叠的融合蛋白如谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 融合表达<sup>[15]</sup>。在前期工作中, 利用 GST 表达系统也成功实现了河南华溪蟹的表达, 但目的蛋白多以包涵体的形式存在, 可溶表达量有限。本研究利用两种特殊的表达系统: SUMO 融合表达系统和 phoA 分泌表达系统, 实现了河南华溪蟹 MT 的重组可溶表达。在 SUMO 系统中, MT 通过融合 SUMO tag, 利用其促溶、促折叠等特性实现了体

外重组可溶表达。而在 phoA 表达系统中, 河南华溪蟹 MT 蛋白被分泌表达至细胞周质中, 降低了 MT 的细胞毒性, 同时细胞周质中氧化还原环境较弱, 能够最大程度的保证 MT 的天然构象, 克服了仅带有 6 × His 小分子量标签 MT 的表达困难<sup>[16]</sup>, 实现了其可溶分泌表达。MT 的 M<sub>r</sub> 较低、免疫原性较差<sup>[10]</sup>。SUMO-MT 的成功制备, 在最大程度保持 MT 天然构象的基础上, 大大提高了 MT 的免疫原性。同时利用仅带有较弱免疫原性的 6 × His tag 完成了 MT 的重组表达, 以 His-MT 作为检测抗原筛选 mAb, 大大提高了抗体筛选的特异性和准确性。在杂交瘤筛选过程中, 以 His-MT 作为检测抗原避免 SUMO tag 假阳性的影响, 同时利用 His-IGF 进行交叉筛选也规避了针对 6 × His tag 假阳性, 获得仅针对 MT 的阳性杂交瘤细胞株。同时, 重组 SUMO-MT 和 His-MT 均以可溶形式表达, 最大程度的保持了 MT 的天然构象, 为我们同时筛选针对线性抗原表位和构象表位的 mAb 提供了可能。

本研究通过 2 种不同表达形式实现了河南华溪蟹 MT 蛋白的重组表达, 进一步利用 SUMO-MT 良好的免疫原性和 His-MT 较强的特异性, 利用杂交瘤技术制备了 mAb。实验结果表明, 制备的 mAb 不仅可以特异性识别重组 SUMO-MT 和 His-MT, 而且与内源性组织 MT 也具有良好的反应性。抗 MT mAb 的制备, 对建立敏感、准确、标准化的免疫学检测方法 & 深入研究 MT 的重金属解毒机制具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Hamer DH. Metallothionein [J]. Ann Rev Biochem, 1986, 55: 913 - 951.
- [2] Kägi JH, Schäffer A. Biochemistry of metallothionein [J]. Biochemistry, 1988, 27 (23): 8509 - 8515.
- [3] Carpenè E, Andreani G, Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics [J]. J Trace Elem Med Biol, 2007, 21 (Suppl 1): 35 - 39.
- [4] Hassinen VH, Tuomainen M, Peräniemi S, et al. Metallothioneins 2 and 3 contribute to the metal-adapted phenotype but are not directly linked to Zn accumulation in the metal hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* [J]. J Exp Bot, 2009, 60 (1): 187 - 196.
- [5] Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers [J]. Aquat Toxicol, 2006, 76 (2): 160 - 202.
- [6] Saito H, Nakazato K, Kato M, et al. Determination of metallothionein-3 by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay in experimental animals [J]. J Toxicol Sci, 2013, 38 (1): 83 - 91.

(下转第 855 页)

综上所述, 本研究结果表明 HIF-1 $\alpha$  在 COPD 气流及全身性炎症反应中起到促进作用, 并与 COPD 气流受限密切相关。还需进一步研究其促进炎症的机制, 明确 HIF-1 $\alpha$  在 COPD 发病中的作用机制。

#### 参考文献:

- [1] Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9823): 1341–1351.
- [2] Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70 (5): 1469–1480.
- [3] 陈云荣, 戴爱国, 胡瑞成, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者肺小血管低氧诱导因子 1 $\alpha$  与其羟化酶表达 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28 (3): 234–238.
- [4] Polosukhin VV, Cates JM, Lawson WE, et al. Hypoxia-inducible factor-1 signalling promotes goblet cell hyperplasia in airway epithelium [J]. *J Pathol*, 2011, 224 (2): 203–211.
- [5] 刘奉君, 刘利民, 宋宏伟. 缺氧诱导因子-1 基因多态性与疾病相关性研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25 (11): 1070–1074.
- [6] Yu H, Li Q, Kolosov VP, et al. Regulation of cigarette smoke-mediated mucin expression by hypoxia-inducible factor-1 alpha *via* epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathways [J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32 (4): 282–292.
- [7] Polosukhin VV, Lawson WE, Milstone AP, et al. Association of progressive structural changes in the bronchial epithelium with subepithelial fibrous remodeling: a potential role for hypoxia [J]. *Virchows Arch*, 2007, 451 (4): 793–803.
- [8] Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Zeidler M, et al. HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation [J/OL]. *Respir Res*, 2012, 13: 60.
- [9] Baek KJ, Cho JY, Rosenthal P, et al. Hypoxia potentiates allergen induction of HIF-1 alpha, chemokines, airway inflammation, TGF-beta1, and airway remodeling in a mouse model [J]. *Clin Immunol*, 2013, 147 (1): 27–37.
- [10] 胡瑞成, 戴爱国, 谭双香. 慢性阻塞性肺疾病患者肺部缺氧诱导因子 1 $\alpha$  表达研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25 (8): 491–492.
- [11] 孔春初, 戴爱国. 慢性阻塞性肺疾病患者肺部丝裂原活化蛋白激酶、蛋白激酶 B 和缺氧诱导因子 1 $\alpha$  的表达 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2006, 29 (6): 372–375.
- [12] 王红云, 杜永成, 张焕萍, 等. 香烟烟雾暴露对大鼠肺组织缺氧诱导因子 1 $\alpha$  表达的影响 [J]. *国际呼吸杂志*, 2012, 32 (9): 693–697.
- [13] 李启芳, 戴爱国, 徐平. 慢性阻塞性肺疾病患者肺小血管低氧诱导因子- $\alpha$  的表达 [J]. *中华内科杂志*, 2006, 45 (2): 136–139.
- [14] Yasuo M, Mizuno S, Kraskauskas D, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha in human emphysema lung tissue [J]. *Eur Respir J*, 2011, 37 (4): 775–783.
- [15] Mizuno S, Bogaard HJ, Gomez-Arroyo J, et al. microRNA-199a-5p is associated with hypoxia-inducible factor-1alpha expression in lungs from patients with COPD [J]. *Chest*, 2012, 142 (3): 663–672.
- [16] 罗玲, 高兴林, 李东风, 等. 核因子  $\kappa$ B 和缺氧诱导因子 1 在慢性阻塞性肺疾病患者外周血单个核细胞中的表达 [J]. *国际呼吸杂志*, 2012, 32 (3): 188–192.
- [7] David E, Tanguy A, Riso R, et al. Responses of pacific oyster *crassostrea gigas* populations to abiotic stress in environmentally contrasted estuaries along the atlantic coast of france [J]. *Aquat Toxicol*, 2012, 109: 70–79.
- [8] Schuwerack PM, Lewis JW, Jones P. The potential use of the South African river crab, *Potamonautes warreni*, as a bioindicator species for heavy metal contamination [J]. *Ecotoxicology*, 2001, 10 (3): 159–166.
- [9] He Y, Ma W, Li Y, et al. Expression of metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in *Escherichia coli* enhances tolerance and accumulation of zinc, copper and cadmium [J]. *Ecotoxicology*, 2014, 23 (1): 56–64.
- [10] Kim N, Shon SH, Kim CT, et al. Responses of label-free metallothionein sensor immobilized with thiolated antibody [J]. *Curr Appl Phys*, 2011, 11: 1210–1214.
- [11] 赵峰梅, 齐延红, 何永吉, 等. 一种利用 HCIC 快速纯化抗 rhTF243 单克隆抗体方法的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26 (6): 548–551.
- [12] Ma WL, Yan T, He YJ, et al. Purification and cDNA cloning of a cadmium-binding metallothionein from the freshwater crab *Sinopotamon henanense* [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2009, 56 (4): 747–753.
- [13] 李丹丹, 张馨心, 赵立平, 等. 猪戊型肝炎病毒单克隆抗体的抗原识别位点分析 [J]. *动物医学进展*, 2008, 29 (4): 42–44.
- [14] Mejáre M, Bülow L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals [J]. *Trends Biotechnol*, 2001, 19 (2): 67–73.
- [15] Sauge-Merle S, Lecomte-Pradines C, Carrier P, et al. Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure [J]. *Chemosphere*, 2012, 88 (8): 918–924.
- [16] Yang F, Zhou M, He Z, et al. High-yield expression in *Escherichia coli* of soluble human MT2A with native functions [J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 53 (1): 186–194.

(上接第 847 页)