

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2017.02.009

抗 CD3×CD87 单链双特异抗体介导的单个核细胞 对前列腺癌细胞杀伤作用的体外研究

高婉莉, 杨 黎, 刘 珊, 赵智辉

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子与医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 本研究尝试探讨抗 CD3×CD87 单链双特异抗体介导的单个核细胞对 CD87⁺ 前列腺癌细胞的杀伤作用。首先, 利用基因工程手段, 构建了 pET24a/抗 CD3×CD87 单链双特异抗体原核表达载体; 将重组载体转化 BL-21 (DE3) 感受态细胞, 用 IPTG 诱导蛋白表达; 获得的工程菌经超声破碎, 先在变性条件下亲和纯化目的蛋白, 再采用稀释复性方法对 scBsAb 进行复性。其次, 利用流式细胞术检测表达纯化的 scBsAb 与两种相应抗原的结合情况。最后, 通过 CCK-8 法检测外周血单个核细胞(PBMCs)对 CD87 阳性前列腺癌细胞 PC-3 的杀伤效应。结果表明, 利用基因工程手段获得了较高纯度的 scBsAb; scBsAb 能与 PC-3 细胞表面 CD87 特异性结合, 并且能与 CD3 特异性结合; scBsAb 的浓度及效靶比影响 scBsAb 介导的杀伤作用。在效靶比为 10:1, scBsAb 浓度为 100 μg/mL 时最大杀伤率达到 40.86%; 在 scBsAb 浓度为 100 μg/mL, 效靶比为 40:1 时达到最大杀伤率 60.9%。此外, ELISA 检测表明, 在 scBsAb 介导的 PBMCs 靶向 CD87 阳性肿瘤细胞杀伤过程中 IFN-γ 的水平显著增高。结果证明, scBsAb 能够在体外有效介导效应细胞杀伤 CD87 阳性肿瘤细胞。

[关键词] 单链双特异抗体, 胞毒作用, 前列腺癌, 原核表达

[中图分类号] Q819 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2017)02-0051-06

Bispecific Anti-CD3×Anti-CD87 Single-Chain Antibody Mediates Cytolytic Activity of Mononuclear Cells Against CD87-Positive Prostate Cancer *in vitro*

Gao Wanli, Yang Li, Liu Shan, Zhao Zhihui

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products,
Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this study, the aim was to investigate whether anti-CD3×anti-CD87 single-chain bi-functional specific antibody (scBsAb) could mediate the cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) against CD87-positive prostatic cancer cells. First, the prokaryotic expression vector of pET24a/scBsAb was constructed and transformed into competent cells of *E. coli* BL-21 (DE3) by genetic engineering technique. After induction with IPTG, the bacteria were ultrasonicated, and scBsAb in the form of inclusion bodies were harvested by centrifugation. The scBsAb was further purified by affinity chromatography under denaturing conditions and refolded by dilution. Second, the antigens binding activity of scBsAb was examined by flow cytometry. Lastly, the scBsAb-mediated cytotoxicity of PBMCs against CD87-positive prostatic cancer cell line PC-3 was determined by using CCK-8 assay. Our results showed that the scBsAb with high purity was obtained. scBsAb could both specifically bind to CD87 and CD3. The scBsAb-mediated killing of PBMCs against CD87⁺ PC-3 cells was related to the concentration of used scBsAb and the ratio of effector to target (E:T). When E:T was 10:1 and the scBsAb concentration was 100 μg/mL, the killing rate was 40.86%; whereas when the E:T ratio was 40:1 and scBsAb concentration was 100 μg/mL, the killing rate was 60.9%. In addition, ELISA assay showed that IFN-γ level in the co-culture system was significantly increased during the killing process. Our data indicate that anti-CD3×anti-CD87 scBsAb could mediate PBMCs to kill CD87-positive tumor cells *in vitro*.

Key words: single chain bispecific antibody, cytotoxicity, prostate cancer, prokaryotic expression

收稿日期: 2017-01-08.

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划集成项目子课题(2013104GZ90073).

通讯联系人: 赵智辉, 博士, 教授, 研究方向: 抗肿瘤新药研究. E-mail: zhaozhihui_1964@aliyun.com

双特异性抗体(BsAb)是目前肿瘤免疫治疗的热点研究内容^[1]. 在肿瘤靶向治疗中,常见的双特异性抗体含有两个抗原的结合位点,其中一个靶向效应细胞表面抗原,另一个靶向肿瘤细胞相关抗原(TAA)^[2]. CD3 是常见的 T 细胞靶向抗原,在 T 细胞表面均有表达^[3],而且 CD3 复合体具有触发 T 细胞的潜能,因此靶向 CD3 的双特异性抗体被广泛研究. CD87 又被称为尿激酶型纤溶酶原激活剂受体(uPAR). CD87 是高度糖基化的单链膜蛋白,分子量约为 50 kDa~60 kDa^[4]. CD87 是一个多功能蛋白,除了在纤溶酶原激活系统中发挥重要作用之外,它还通过与其他细胞表面分子的相互作用,参与不同的生理或病理过程,包括细胞粘附、细胞迁移、血管生成、肿瘤的侵袭和肿瘤的转移等过程^[5]. CD87 通常在单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、活化的 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞(NK)上表达^[6-8],然而在红细胞,血小板或静息的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞表面不表达^[6,9-10]. 有研究表明 CD87 的表达水平与肿瘤的恶性程度有关^[11],在人恶性肿瘤组织中 CD87 的表达水平远高于其在正常组织和良性肿瘤中的表达水平. 本研究利用成功构建的 pET24a/抗 CD3×CD87 单链双特异性抗体质粒,表达纯化 scBsAb,并对其介导效应细胞靶向 CD87 阳性前列腺癌细胞的体外杀伤作用展开研究.

1 材料与方法

1.1 材料

克隆菌株 *E. coil* TOP10、表达菌株 *E. coil* BL21(DE3)、原核表达载体 pET24a 均由本实验室保存. 高保真 Taq 酶、dNTP mix、6×loading buffer、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 连接酶、10×T4 buffer、10×K buffer、感受态细胞制备试剂盒和核酸标准相对分子质量均购于 Takara 公司. 质粒小提试剂盒和割胶回收试剂盒购于 Axygen. 蛋白分子量标准购于 Thermo 公司,酵母提取物和蛋白胨购于 OXOID 公司. 卡那霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、L-精氨酸、二硫苏糖醇、氧化型谷胱甘肽和尿素购于索莱宝生物科技有限公司. PEG20000 和氯化钠购于国药集团化学试剂有限公司,鼠抗 His 单克隆抗体购于南京巴傲得生物科技有限公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠二抗购于诺唯赞生物科技有限公司.

细胞培养所使用的抗生素(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)、胰酶、培养基 DMEM 和 RPMI 1640 购自 Wisent 公司. 胎牛血清购自于 Hyclone 公司. CCK-8 试剂盒购于上海七星复泰生物科技有限公司,淋巴分离液购于索莱宝生物科技有限公司. 细胞因子 IL-2 购于南京巴傲得生物科技有限公司,抗人 CD87 单克隆抗体购于 R&D 公司. FITC 蛋白标记试剂盒购于 Pierce 公司. 人干扰素-γ ELISA 试剂盒购于上海西塘生物科技有限公司. 引物由拓达生物科技公司合成.

人外周血来自于健康志愿者的外周静脉血.

1.2 主要仪器

Biofuge Pico 高速台式离心机、BB5060UV 细胞培养箱、HEAL FORCE 生物安全柜、ELx 808 酶标仪、SS-325 高压蒸汽灭菌锅、DC1010 恒温水浴锅、倒置荧光显微镜、Accuri C6 流式细胞仪等.

1.3 实验方法

1.3.1 抗 CD3×CD87 基因片段的设计和表达载体的构建

根据文献的报道,将抗 CD3^[12]和 CD87^[13]单克隆抗体的可变区基因片段,以柔性多肽 G4S(Gly4-Ser)连接,并根据 pET24a 表达载体的多克隆位点选择酶切位点,设计 PCR 扩增引物,并在上下游引物的 5' 段分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线标出).

上游引物:5'-CGCGGATCCATGGAGTCTGGGGCTGAACTGGC-3'(*Bam*H I);

下游引物:5'-CCGCTCGAGCCGTTTTATTTCAGCTTGG-3'(*Xho* I).

以合成的 pET28a/scBsAb 为模板,PCR 扩增含有酶切位点的 scBsAb 基因,割胶纯化大小正确的条带. 回收完毕,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定回收片段. 将大小正确的回收产物进行双酶切,T4 连接酶连接载体和目的基因片段,构建 pET24a/scBsAb 表达载体. 次日将酶连产物转化 TOP 10 感受态细菌,涂布于卡那平板上,37 °C 倒置培养过夜. 挑取单克隆,经菌落 PCR、*Bam*H I 和 *Xho* I 酶切验证,将阳性克隆接菌小提质粒,将质粒送至上海杰李测序,测序结果与目的基因片段序列进行比对,将测序正确的重组质粒命名为 pET24a/scBsAb.

1.3.2 pET24a/scBsAb 原核表达

将 pET24a 空载质粒和 pET24a/scBsAb 质粒转化至 BL21(DE3) 中,涂布于卡那 LB 平板上,37 °C 倒置培养过夜.挑取单克隆接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C,220 r/min 振荡培养.当菌体 OD 600 约为 0.5~0.6 之间时,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,24 °C,180 r/min 诱导 10 h.诱导结束后取 1 mL 培养物装入 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,得到菌体沉淀.用 800 μL 1×PBS 重悬菌体,置于冰浴中超声破碎.超声破碎条件设置为工作 5 s,间歇 6 s,功率 300 W.破碎完成后,分别取全菌、上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析.

1.3.3 scBsAb 的纯化及鉴定

当菌体 OD 600 约为 0.5~0.6 之间时,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,16 °C,100 r/min,诱导 18 h,诱导结束后离心收集菌体沉淀.将诱导表达菌体重悬于 1×PBS,置于冰浴中超声破碎.将上述破碎产物 12 000 g,4 °C 离心 15 min,收集包涵体.包涵体重悬于洗涤液中(20 mmol/L Tris,2 mol/L 尿素,1 mmol/L EDTA-2Na,1% Triton X-100,1 mol/L 氯化钠),反复吹打均匀,离心收集包涵体,用洗涤液洗涤包涵体 2 遍,第 3 遍用 1×PBS 洗涤.最后将包涵体溶解于变性缓冲液中(8 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-盐酸缓冲液,pH 7.6),反复吹打,冰上溶解 60 min.

平衡 Ni-IDA 树脂,将含有目的蛋白的溶液上样至 Ni 柱中,并以不同浓度咪唑缓冲液洗脱,收集穿流液和不同浓度咪唑洗脱液.经 SDS-PAGE 检测,将含有目的蛋白的咪唑洗脱液缓慢逐滴加入 4 倍体积的复性液中(0.6 mol/L L-Arg,10 mmol/L DTT,1 mmol/L 还原型谷胱甘肽),4 °C 放置过夜.透析、浓缩得到纯化蛋白,浓缩后蛋白样品采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定其蛋白质浓度,Western Blotting 检测浓缩蛋白.纯化获得蛋白溶液放于-80 °C 保存备用.

1.3.4 FITC 标记 scBsAb

纯化得到的 scBsAb 依照 Pierce 公司使用说明进行异硫氰酸荧光素(FITC)标记.在充分透析除去游离的 FITC 后,避光储存于-20 °C.

1.3.5 分离外周血单个核细胞

按照淋巴分离液说明书分离得到 PBMCs.将分离得到的 PBMCs 用含 10% 胎牛血清、50 U/mL IL-2、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基在 37 °C,5% CO₂ 细胞培养箱中培养.

1.3.6 流式检测

将 1×10⁶ 个细胞(CD87 阳性/阴性肿瘤细胞系或 PBMCs)用冷 1×PBA 离心洗涤一遍,每个细胞样品与纯化 scBsAb-FITC(100 μg/mL)混匀后,冰上避光孵育 60 min.离心弃去上清,再用冷 1×PBS 离心洗涤样品 2 次.之后利用 Accuri C6 流式细胞仪检测 scBsAb 结合活性.利用 Accuri 软件分析流式结合数据.

1.3.7 scBsAb 介导的细胞毒作用

采用 CCK-8 试剂盒测定 scBsAb 介导的细胞毒作用.靶细胞为 PC-3 或 MCF-7,效应细胞为 PBMCs,效靶比为 10:1,scBsAb 浓度为 5 μg/mL 至 100 μg/mL,测定步骤如下:

按照 4×10³ 细胞/孔数量接种靶细胞至 96 孔板中,于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 6 h~8 h.吸出 96 孔板中的靶细胞培养上清,PBMCs 按照 4×10⁴/孔的数量加入 96 孔平板,再加入不同剂量的 scBsAb,37 °C 孵育 36 h;弃去培养基,用 1×PBS 洗细胞 2 遍,每孔加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 100 μL 及 10 μL CCK-8 溶液.前后轻轻晃动培养板数次.细胞培养箱内继续孵育 4 h,分别用酶标仪在 450 nm 下检测 OD 值,每个实验组至少设 3 个复孔.

根据以下公式计算杀伤率:杀伤率=(1-OD 实验组/OD 对照组)×100%.

根据上述实验结果,选择 scBsAb 浓度为 100 μg/mL(或作为对照的抗人 CD87 单克隆抗体浓度为 100 μg/mL),测定不同效靶比下 scBsAb 介导的杀伤百分数.上述实验至少设 3 个复孔,实验重复 3 次.运用 Graph Prism 和 SPASS 13.0 软件统计分析 scBsAb 介导的细胞毒作用.

1.3.8 细胞因子的检测

按照 4×10³ 细胞/孔数量接种 PC-3 或 MCF-7 至 96 孔板,效应细胞为 PBMCs,效靶比为 10:1,scBsAb 浓度为 100 μg/mL,实验组将 scBsAb、效应细胞和靶细胞于 37 °C 培养箱中共培养 24 h.对照组仅加入效应细胞,其他操作均与实验组一致,每组设 3 个复孔.离心收集无细胞的培液上清,按照人 IFN-γ ELISA 试剂

盒说明书检测细胞培养液中 IFN- γ 的水平,IFN- γ 含量由标准曲线计算得到.

1.3.9 统计学分析

实验数据采用均值和标准误(mean \pm SEM)来表示,数据间的显著性差异用 one-way ANOVA 或 *t* 检验,图由 Graph Prism 完成. 实验重复 3 次或以上,当 $P < 0.05$, * 表示具有统计学显著差异.

2 结果与讨论

2.1 scBsAb 的表达、纯化及鉴定

成功构建原核表达载体 pET24a/scBsAb(图 1),并将空载和重组 pET24a 质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,IPTG 诱导蛋白表达,对照组不加 IPTG,收集全菌、上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳. 结果如图 2(a)所示,在约 55 kDa 处有明显目的蛋白的表达条带,而对照组中均没有此条带. 之后将超声破碎获得的包涵体,经过洗涤、溶解于含 8 mol/L 尿素的变性缓冲液中. 变性的目的蛋白经 Ni 柱纯化、复性、透析和浓缩后获得 scBsAb. 通过 BCA 蛋白定量方法及灰度比较,从 500 mL 培养物可纯化获得 6.56 mg 的目的蛋白. 纯化得到 scBsAb 进行 Western Blotting 鉴定,结果显示在约 55 kDa 处有目的条带(图 2(b)),从而证明 scBsAb 蛋白表达成功.

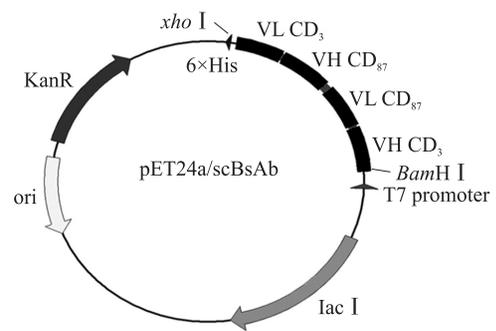
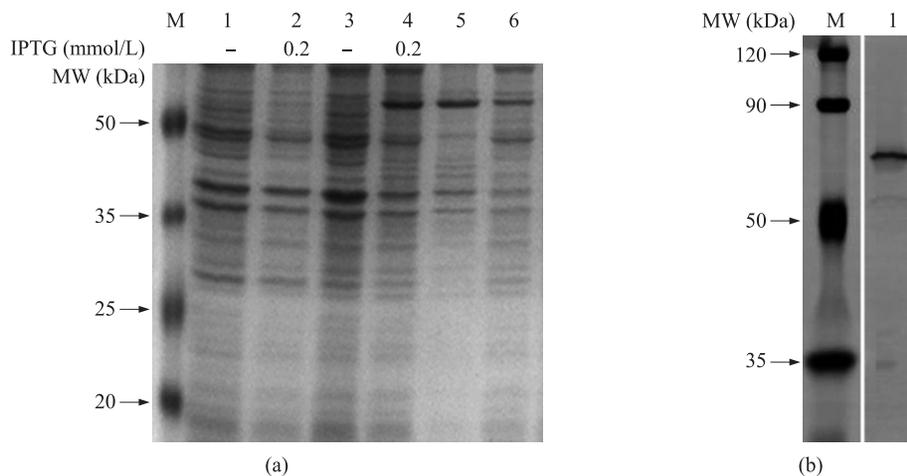


图 1 表达载体 pET24a/scBsAb 图谱
Fig. 1 The map of expression vector pET24a/scBsAb

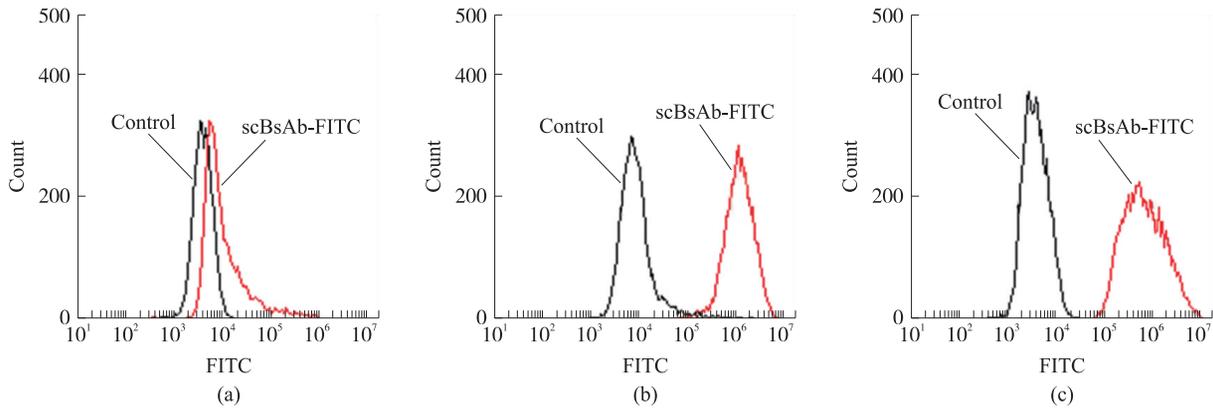


(a)SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达;M:标准分子蛋白;1:未诱导的 pET24a 全菌;2:IPTG 诱导的 pET24a 全菌;3:未诱导的 pET24a/scBsAb 全菌;4:IPTG 诱导的 pET24a/scBsAb 全菌;5:IPTG 诱导的 pET24a/scBsAb 破碎沉淀;6:IPTG 诱导的 pET24a/scBsAb 破碎上清. (b)Western Blotting 鉴定复性 scBsAb;M:标准分子蛋白;1:纯化蛋白
(a)The SDS-PAGE analysis of total bacterial cell lysates, supernatant and sediment with and without induction by IPTG. M,marker protein;Lanes 1-2,cells transformed with pET24a empty vector;Lanes 3-6,cells transformed with pET24a/scBsAb. Lanes 1-4 are total bacterial cell lysates. Lane 5 is sediment of cells transformed with pET24a/scBsAb. Lane 6 is supernatant of cells transformed with pET24a/scBsAb. (b) Expressed protein was identified by Western Blotting. M,protein marker;Lane 1,purified scBsAb

图 2 目的蛋白的表达及鉴定
Fig. 2 Expression and identification of scBsAb

2.2 流式细胞分析

利用流式细胞仪,以人乳腺癌细胞系 MCF-7 作为对照,以高表达 CD87 的人前列腺癌细胞系 PC-3 以及表达 CD3 的 PBMCs 作为实验组,分析 scBsAb 的结合活性. 如图 3 所示,scBsAb 能够与 PC-3 细胞表面的 CD87 特异性结合,PC-3 细胞表面的荧光强度显著高于 MCF-7 细胞表面. 此外 scBsAb 能与 CD3 特异性结合.



(a)(b)将 MCF-7 细胞或 PC-3 细胞与 scBsAb-FITC(红色曲线)孵育。(c)将 PBMCs 与 scBsAb-FITC(红色曲线)孵育。黑色曲线表示阴性对照(即未与 scBsAb 共孵的 MCF-7,PC-3 或 PBMCs)

(a)(b) MCF-7 cells or PC-3 cells were incubated with scBsAb-FITC (red histogram).(c) PBMCs were incubated with scBsAb-FITC (red histogram). Black histogram is negative control(MCF-7,PC-3, or PBMCs alone)

图 3 流式细胞术检测 scBsAb 结合活性

Fig. 3 Flow cytometry based binding assay for scBsAb

2.3 scBsAb 介导的细胞毒作用的测定

采用 CCK-8 法测定 scBsAb 介导 PBMCs 对于肿瘤细胞的杀伤活性. 为了接近体内的条件,采用未刺激的人 PBMCs 作为效应细胞. 当效靶比为 10:1,scBsAb 浓度范围为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,靶细胞为 PC-3 时,scBsAb 介导的 PBMCs 特异性杀伤 PC-3 百分数为 3.93~40.85;在相同条件下,当靶细胞为 MCF-7 时,特异杀伤百分数明显降低,为 0.87~7.87(图 4(a)). 以上结果表明,scBsAb 介导的细胞毒性依赖于细胞表面 CD87 的密度. 当 scBsAb 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,效靶比范围为 2.5:1~40:1 时,对 scBsAb 介导的肿瘤细胞杀伤作用进行测定. 在效靶比达到 40:1 时,对于 PC-3 细胞的杀伤百分数达到了 60.9(图 4(b)). 以 PC-3 细胞为靶细胞时,scBsAb 介导的细胞毒活性显著高于抗人 CD87 单克隆抗体($P<0.05$).

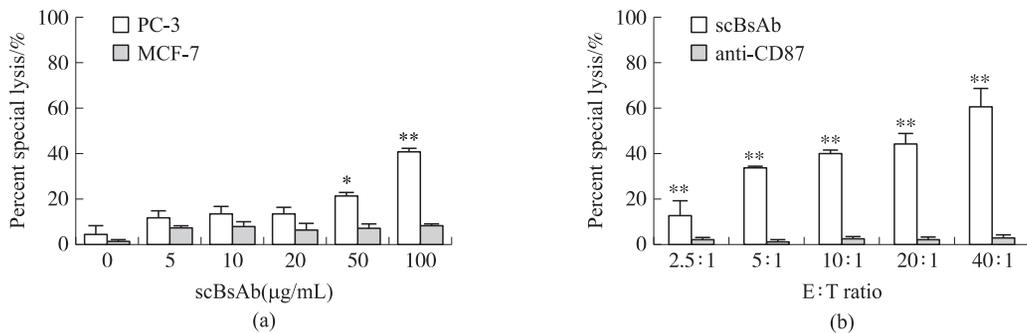


图 4 scBsAb 介导 PBMCs 对肿瘤的杀伤作用

Fig. 4 Killing of tumor by scBsAb-mediated PBMCs

2.4 细胞因子 IFN- γ 水平检测

ELISA 检测发现,两组对照组本身会释放一定量的 IFN- γ ,以 PC-3 为靶细胞的实验组的培养液中 IFN- γ 的水平显著高于对照组和 MCF-7 实验组中 IFN- γ 的水平($P<0.05$),IFN- γ 分泌量达到 275.3 pg/mL .

3 讨论

研究表明,双特异性抗体具有介导 T 细胞发挥杀伤作用的潜能^[14]. 目前已有两个双特异性抗体被批准应用于临床治疗^[15]. 而对双功能抗体的设计聚集在不同的 TAA,常用的 TAA 为 CD19、CD20、上皮细胞粘附分子、受体酪氨酸蛋白激酶 erbB-2、表皮生长因子受体等^[16]. 在本研究中,检验了 CD87 是否能够作为治疗前列腺癌

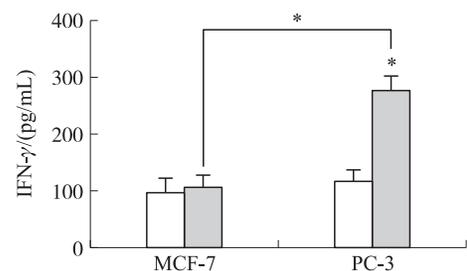


图 5 ELISA 检测 IFN- γ 的分泌

Fig. 5 The secretion of IFN- γ detected by ELISA

的新型双特异性抗体的作用靶点,并于体外研究 scBsAb 介导 PBMCs 抗肿瘤作用. 成功构建了 pET24a/scBsAb,之后对 scBsAbs 分布进行研究,发现目的蛋白在上清和沉淀中均有分布,但是目的蛋白在上清中的分布较少,而在沉淀中含有较多的目的蛋白. 由于构建的 scBsAb 缺少抗体的 Fc 段,因此在后续蛋白纯化的过程中无法选择常规的 Protein A/G 亲和层析的纯化方式. 曾试图利用 scBsAbs 下游带有 His 标签,采取镍离子亲和层析柱纯化可溶性目的蛋白. 但即使反复优化诱导表达条件均未能改善分布在上清中的可溶性 scBsAb 与镍离子亲和层析柱不结合的情况. 因此改变了纯化策略,采用了在变性条件下纯化包涵体中的目的蛋白,复性获得 scBsAb 的纯化策略. 获得了较高纯度的 scBsAb,进而对其生物学活性展开研究. 通过流式细胞仪分析证实,scBsAb 能与高表达 CD87 的前列腺癌细胞系 PC-3 特异性结合,而且 scBsAb 能特异性与 PBMCs 表面的 CD3 相结合. 结果表明,scBsAb 能够在体外介导效应细胞发挥靶向 CD87 阳性前列腺癌细胞的细胞毒作用,但是单独使用抗 CD87 单克隆抗体对于前列腺癌细胞的细胞活力没有影响. 参考相关文献^[17-20],实验中采用效靶比 2.5:1~40:1. 为了接近体内的条件,采用未刺激的人 PBMCs 作为效应细胞. 当 scBsAb 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,效靶比为 40:1 时,最大杀伤率能够达到 60.9%. 此外,发现 scBsAb 介导的效应细胞发挥杀伤作用的同时产生了较高水平 IFN- γ 的分泌. 总之,这都为进一步的体内实验和 scBsAb 的临床应用奠定了基础.

[参考文献]

- [1] 方敏,赵瑞,李骅,等. 抗人卵巢癌 \times 抗人 CD3 双特异性单链抗体的构建,表达及复性研究[J]. 高技术通讯,2002,12(11):47-50.
- [2] ARNDT C,FELDMANN A,TÖPFER K,et al. Redirection of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes via a novel antibody-based modular targeting system triggers efficient killing of PSCA⁺ prostate tumor cells[J]. The prostate,2014,74(13):1 347-1 358.
- [3] WOLF E,HOFMEISTER R,KUFER P,et al. BiTEs:bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity[J]. Drug discovery today,2005,10(18):1 237-1 244.
- [4] NIELSEN L,KELLERMAN G,BEHRENDT N,et al. A 55 000-60 000 Mr receptor protein for urokinase-type plasminogen activator. Identification in human tumor cell lines and partial purification[J]. Journal of biological chemistry,1988,263(5):2 358-2 363.
- [5] GE Y,ELGHETANY M T. Urokinase plasminogen activator receptor(CD87):something old,something new[J]. Laboratory hematology,2003,9:67-72.
- [6] PLESNER T,BEHRENDT N,PLOUG M. Structure,function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor,uPAR[J]. Stem cells,1997,15(6):398-408.
- [7] GHANNADAN M,BAGHESTANIAN M,WIMAZAL F,et al. Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies[J]. Journal of investigative dermatology,1998,111(4):689-695.
- [8] EBNER S,LENZ A,REIDER D,et al. Expression of maturation-/migration-related molecules on human dendritic cells from blood and skin[J]. Immunobiology,1998,198(5):568-587.
- [9] HADDOCK R C,SPELL M,BAKER C,et al. Urokinase binding and receptor identification in cultured endothelial cells[J]. Journal of biological chemistry,1991,266(32):21 466-21 473.
- [10] MORITA Y,HAYASHI Y,WANG Y,et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,1997,25(4):856-861.
- [11] 赵茜,吴秋良,梁小曼,等. uPA,uPAR,nm23-HI 在大肠癌中的表达及其与肿瘤侵袭和转移的关系[J]. 肿瘤防治研究,2004,31(11):695.
- [12] KIPRIYANOV S M,MOLDENHAUER G,MARTIN A,et al. Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity[J]. Protein engineering,1997,10(4):445-453.
- [13] LI Y,PARRY G,CHEN L,et al. An anti-urokinase plasminogen activator receptor(uPAR) antibody:crystal structure and binding epitope[J]. Journal of molecular biology,2007,365(4):1 117-1 129.
- [14] 范冬梅,李崑,杨铭,等. 双功能抗体抗 CD3/抗 CD19 介导 T 细胞对靶细胞的杀伤作用[J]. 中国癌症杂志,2011,21(1):6-11.

(下转第 64 页)

- Journal of experimental botany,2000,61:2 131-2 143.
- [31] KRUK I, MICHALSSKA T, LICHSZTEDLD K, et al. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species[J]. Chemosphere,2000,41(7):1 059-1 064.
- [32] AL-MALKI A L. Antioxidant properties of thymol and butylated hydroxytoluene in carbon tetrachloride-induced mice liver injury[J]. Journal of king abdulaziz university-science,2010,22:239-248.
- [33] ABD-ELHAKIM Y M, MOHAMED W A M. Assessment of the role of thymol in combating chromium(VI)-induced oxidative stress in isolated rat erythrocytes *in vitro*[J]. Toxicological and environmental chemistry,2016,98(10):1-14.
- [34] SHETTIGAR N B, DAS S, RAO N B, et al. Thymol, a monoterpene phenolic derivative of cymene, abrogates mercury-induced oxidative stress resultant cytotoxicity and genotoxicity in hepatocarcinoma cells[J]. Environmental toxicology,2015,30(8):968-980.
- [35] KIM Y S, HWANG J W, KANG S H, et al. Thymol from *Thymus quinquecostatus* Celak. protects against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in Chang cells[J]. Journal of natural medicines,2014,68(1):154-162.
- [36] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in plant science,2002,7(9):405-410.

[责任编辑:黄敏]

(上接第56页)

- [15] RATHI C, MEIBOHM B. Clinical pharmacology of bispecific antibody constructs[J]. The journal of clinical pharmacology,2015,55(S3):S21-S28.
- [16] MORECKI S, LINDHOFER H, YACOVLEV E, et al. Induction of long-lasting antitumor immunity by concomitant cell therapy with allogeneic lymphocytes and trifunctional bispecific antibody[J]. Experimental hematology,2008,36(8):997-1003.
- [17] XIE Z, NING G, MING Y, et al. A new format of bispecific antibody: highly efficient heterodimerization, expression and tumor cell lysis[J]. Journal of immunological methods,2005,296(1/2):95-101.
- [18] GUETTINGER Y, BARBIN K, PEIPP M, et al. A recombinant bispecific single-chain fragment variable specific for HLA class II and Fc α RI(CD89) recruits polymorphonuclear neutrophils for efficient lysis of malignant B lymphoid cells[J]. The journal of immunology,2010,184(3):1 210-1 217.
- [19] BRUENKE J, BARBIN K, KUNERT S, et al. Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and Fc γ RIII(CD16)[J]. British journal of haematology,2005,130(2):218.
- [20] ZHANG L, HOU Y, ZHANG J, et al. Cytotoxicity of cytokine-induced killer cells targeted by a bispecific antibody to gastric cancer cells[J]. Oncology letters,2013,5(6):1 826-1 832.

[责任编辑:黄敏]