doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.003

人宫颈癌基因蛋白单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用 *

陈 锋[1,2] 姥 勇[3] 陈旭义[3] 樊豪军[3] 侯世科[3△]

(1 天津医科大学研究生院 天津 300070;2 武警后勤学院训练部 天津 300309;
3 武警后勤学院附属医院 天津 300016)

摘要 目的:制备人宫颈癌基因蛋白单克隆抗体并初步用于肝癌血清检测。**方法:**重组表达 HCCR-1 蛋白胞外区(第 167th-360th 氨基酸)进行动物免疫,用含有 HCCR 蛋白抗原表位的融合蛋白筛选阳性克隆。通过 ELISA、Western Blot、免疫组化鉴定抗体性质,并用于肝癌血清样本检测。**结果:**获得 3 株抗人 HCCR 蛋白单克隆抗体,其中 B3 抗体特异性、灵敏度较好。ELISA 结果表明 B3 只识别 GST-HCCRep 蛋白和 His-HCCR 蛋白,与其他蛋白没有交叉反应;B3 可检测到 10 mg /L 的 GST-HCCRep 蛋白;B3 抗体亲和力常数 Kaff=1.86× 10^7(L/mol);Western Blot 结果表明该抗体可识别天然 HCCR 蛋白;免疫组化检测表明肝癌组织中有 HCCR 蛋白表达而正常组织中未见表达;肝癌患者血清 HCCR 阳性率达到 75%。**结论:**成功制备了 HCCR 单克隆抗体,为建立新的肝癌早期诊断方法奠定了基础。

关键词:人宫颈癌基因;单克隆抗体;肝癌;早期诊断

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3212-04

Preparation, Characterization and Application of Anti-HCCR Monoclonal Antibody*

CHEN Feng[1,2], MU Yong[3], CHEN Xu-yi[3], FAN Hao-jun[3], HOU Shi-ke[3△]

(1 Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China;
2 Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin, 300309, China;
3 Affiliated hospital, Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin, 300162, China)

ABSTRACT Objective: To prepare monoclonal antibody (mAb) against HCCR. **Methods:** The extracellular segment of HCCR-1 (aa 167 to 360) was expressed and used to immunize Balb/c mice. Another protein GST-HCCRep, containing HCCR epitope (YLGTRR) was expressed and purified to detect the titers of serum antibody and screen the positive hybridomas. The mAb was characterized by ELISA, Western blot and immunohistochemistry. **Results:** The ELISA analysis indicated that the B3 mAb specifically recognized His-HCCR and GST-HCCRep protein, and showed no cross-reaction with other proteins; the detection limit of B3 mAb reached 10ng/ml of GST-HCCRep protein; the affinity constant of B3 mAb was 1.86× 10^7 L/mol; HCCR was found high-expressed in HCC cell lines HepG2 and 7721, as well as human HCC tissues. Neither normal hepatic cell line L02 nor normal liver tissues showed HCCR positive. The results showed that positive rate of HCCR in serum samples of HCC patients reached 58%. **Conclusion:** A specific mAb against HCCR was successfully generated and provided the foundation for future development of good methods for HCC diagnosis.

Key words: Human cervical cancer oncogene; Monoclonal antibody; Hepatocellular carcinoma; Eearly diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3212-04

前言

肝癌是我国比较常见的恶性肿瘤,位于恶性肿瘤死亡的第二位[1],由于其发病隐匿,难以早期诊断。目前临床上以 AFP 为血清检测的金标准,但是其特异性和灵敏度较低,一直以来,各国科学家都致力于寻找新的肝癌早期诊断标志物。2003 年,韩国 Ko 等首次发现人宫颈癌基因(Human cervical cancer oncogene, HCCR),后续研究表明其在肝癌患者中过量表达,在肝硬化患者中中度表达,而在正常肝中不表达或低表达[2,3]。HCCR 与 AFP 联合检测可显著提高肝癌诊断率,HCCR 很希有望成为临床新的肝癌血清诊断标志物[4,5]。

本课题通过重组表达 HCCR 蛋白胞外区部分作为免疫原制备抗 HCCR 单克隆抗体,为研究肝癌患者血清 HCCR 蛋白含量、建立新的检测方法奠定了基础。

* 基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(12JCZDJC24100)
作者简介:陈锋(1979-),男,硕士研究生,主要研究方向:基因工程药物,
电话:13269211175,E-mail:chen_feng80@126.com
△通讯作者:侯世科,电话:022-84876708,E-mail:sk_hou@126.com
(收稿日期:2013-12-08 接受日期:2013-12-31)

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验使用 6-8 周雌性 BALB/c 鼠,体重约 20g,由天津医科大学实验动物中心提供。质粒 pET-28a 和 pGEX-4T-2、大肠杆菌 DH5α 和 BL21(DE3)、HepG2 细胞、GST 蛋白、小鼠骨髓瘤细胞 Sp2 /0 由本实验保存。PCR mix、胶回收试剂盒、限制性内切酶购自 Fermentas 公司;RPMI1640 培养基、HAT 和 HT 培养基购自 Invitrogen 公司; 山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记二抗购购自中杉金桥公司;血清样本、组织切片由武警后勤学院附属医院提供;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 抗原及检测蛋白制备 PCR 扩增 HCCR-1 蛋白胞外区第 167-360 个氨基酸的编码基因,与 pET-28a 载体联接,测序正确的载体转化 BL21(DE3)宿主菌, IPTG 诱导表达,镍柱亲和纯化, 蛋白命名为 His-HCCR, 该蛋白用于动物免疫。同时扩增 HCCR-1 蛋白第 355-360 个氨基酸的编码基因, 与 pGEX-4T-2 载体联接,测序正确的载体转化 BL21(DE3)宿主菌,IPTG 诱导表达,用谷胱甘肽琼脂糖亲和柱纯化蛋白,命名为 GST-HCCR-ep,该蛋白用于小鼠血清抗体检测及杂交瘤细胞筛选。

1.2.2 动物免疫及抗血清检测 第一次免疫将纯化的 His-HCCR 蛋白与弗氏完全佐剂等比例混合, 腹腔注射 3 只 6-8 周 BALB/c 雌性小鼠。从第二次免疫开始,纯化的 His-HCCR 蛋白与弗氏不完全佐剂等比例混合,每两周免疫一次,共免疫 4 次。包被 GST-HCCRep 蛋白检测小鼠血清抗体效价。

1.2.3 单克隆抗体制备 选择血清抗体效价达到 1:104 的小鼠进行融合, 融合前三天加强免疫一次。取小鼠脾脏, 研磨,与 Sp2 /0 细胞按照 10:1 的比例混合, 用无血清培养基洗涤 2 次, 在 1min 内缓慢的加入 1 mL 50%的 PEG-1500,静置 1 min。加入含 HAT 的筛选培养基培养, 以后每 3-4 天采用半量换液法更换 HT 培养基。包被 GST-HCCRep 蛋白筛选分泌抗 HCCR 抗体的细胞株。有限稀释法对阳性细胞株亚克隆,直至阳性率达到 100%。取 6-8 周雌性 BALB/c 小鼠, 腹腔注射液体石蜡 0.5 mL/ 只,7 天后腹腔注射分泌抗体的细胞 5× 10^6 个 / 只,10 天后收集腹水纯化抗体。

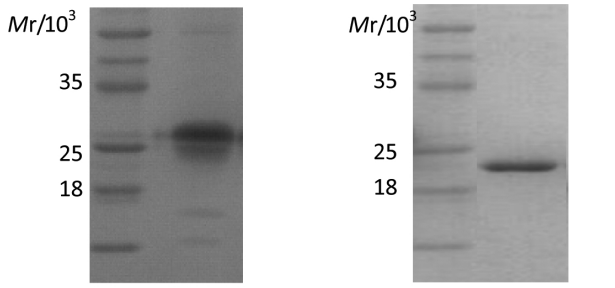
1.2.4 抗体性质鉴定 Sigma a IsoQ5 试纸条测定抗体亚类; ELISA 方法测定抗体特异性、灵敏度及亲和力;Western blot、免疫组化鉴定抗体性质。

1.2.5 肝癌患者血清 HCCR 检测 包被液稀释肝癌患者血清样本(60 例),包被 ELISA 板,BSA 封闭;加入制备的 HCCR 抗体孵育,二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,酶标仪测定 A450 数值。以正常人血清为阳性对照(20 例)。

2 结果

2.1 抗原及检测蛋白制备

测序结果表明,扩增的 2 个基因均正确插入到相应的载体中,正确编码 His-HCCR 和 GST-HCCRep 的宿主经 IPTG 诱导表达后,超声破碎菌体。His-HCCR 蛋白以包涵体形式存在,复性,通过镍柱亲和纯化;GST-HCCRep 蛋白以可溶形式存在,通过谷胱甘肽琼脂糖亲和纯化,(见图 1)



a) His-HCCR b) GST-HCCRep

图 1 重组蛋白 His-HCCR 和 GST-HCCRep 纯化

Fig.1 Purified recombinant protein His-HCCR and GST-HCCRep

2.2 血清抗体效价检测

免疫 4 次后, 包被 GST-HCCRep 蛋白检测小鼠血清抗体效价,同时包被 GST 蛋白做对照。小鼠血清抗体效价均达到 1:104 以上。

2.3 抗体性质鉴定

经亚克隆筛选, 共获得 3 株分泌抗 HCCR 抗体的细胞株(分别命名为 A7、B3、F3), 经特异性和亲和力鉴定,B3 结果均优于 A7 和 F3,所以后续工作主要针对 B3 进行。

(1) 抗体 Ig 类和亚类鉴定: 鉴定结果表明 B3 属于 IgG1 亚类抗体。

(2) B3 特异性测定: 在 96 孔细胞培养板中分别包被 8 种不同的蛋白,以 B3 培养上清为一抗,辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 为二抗。鉴定结果表明该抗体只识别 GST-HCCRep 蛋白和 His-HCCR 蛋白,与其他蛋白没有交叉反应(图 2)。

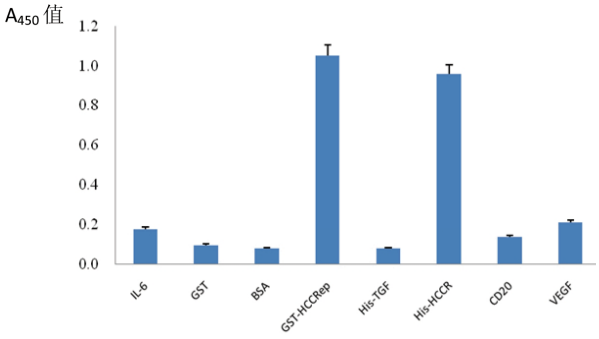


图 2 ELISA 方法测定 HCCR 抗体的特异性

Fig.2 The specificity analysis of McAb B3 by ELISA

(3) B3 灵敏度测定: 梯度稀释 GST-HCCRep 蛋白, 包被 96 孔细胞培养板,以纯化的腹水抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 为二抗,酶标仪测定 A450 数值。以 A450 值为纵坐标,GST-HCCRep 蛋白浓度为横坐标做曲线(图 3)。该抗体可检测到 10 mg /L 的 GST-HCCRep 蛋白。

(4) 抗体亲和常数测定:包被 GST-HCCRep 蛋白,浓度分别为 3 mg/L,1.5 mg/L,0.75 mg/L,0.325 mg/L。倍比稀释抗 HCCR 抗体。以抗体浓度对数为横坐标,A450 为纵坐标做曲线(图 4)。亲和力常数 Kaff = (n-1) /2(n[Ab']t - [Ab]t),其中[Ab]t 和[Ab']t 分别代表抗原浓度为 Ag 和 Ag'时,达到最大吸光值一半时的抗体浓度(mol/L),n=[Ab]t / [Ab']t。求得 B3 的亲和力常数 K=1.86× 10^7(L/mol)。

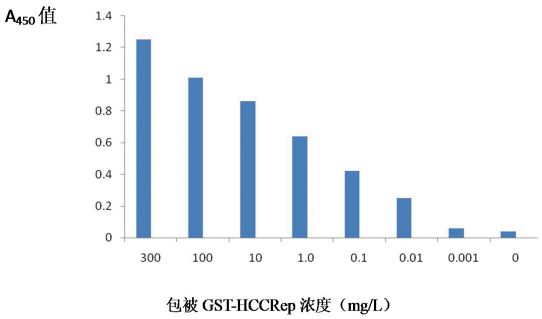


图 3 HCCR 抗体灵敏度分析

Fig.3 The sensitivity analysis of McAb HCCR

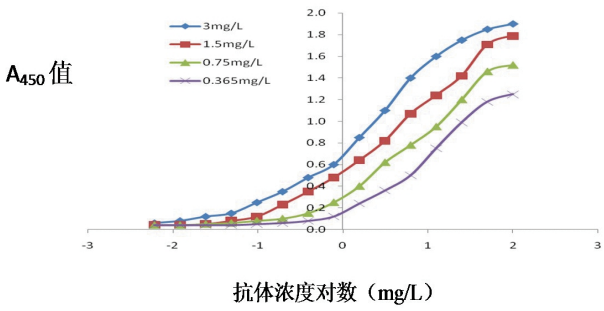


图 4 HCCR 单克隆抗体亲和常数测定

Fig.4 Affinity constant analysis of McAb HCCR

（5）Western Blot 实验将纯化的 GST-HCCRep 蛋白、His-HCCR 蛋白、HepG2 细胞裂解液进行 SDS-PAGE 电泳后转膜，BSA 封闭，加入 B3 抗体孵育。结果显示，B3 抗体能识别重组的 GST-HCCRep 蛋白和 His-HCCR 蛋白；特异性识别 HepG2 细胞和 7721 细胞中表达的天然 HCCR 蛋白（HCCR-1、HCCR-2），正常肝细胞 L02 中未见 HCCR 蛋白表达（图 5）。

（6）免疫组化实验 组织切片经过烤片、脱蜡、水化后消除内源性过氧化物酶，加入制备的 HCCR 抗体孵育，结果表明该抗体在肝癌细胞中呈阳性反应（图 6）。

（7）血清 HCCR 检测 40 例肝癌患者血清中，HCCR 阳性率为 75%（45/60），AFP 阳性率为 60%（36/60），两者联合阳性率达到 90%（54/60）。（结果见表 1）

3 讨论

肝癌早期诊断在对于提高治疗效果、改善患者生命具有重要作用，目前 AFP 是临床常用的血清检测标志物，但是在肝癌早期其检出率不到 30%[6-9]。因此一直以来人们都在寻找新的、灵敏度更好的肝癌血清检测标志物。GPC3、AFP-L3、GP73 等肝癌相关蛋白出现有望改变肝癌早期诊断的现状，但是它们目前都还处于研究阶段，需要更深入的研究才能评价它们的临床价值。

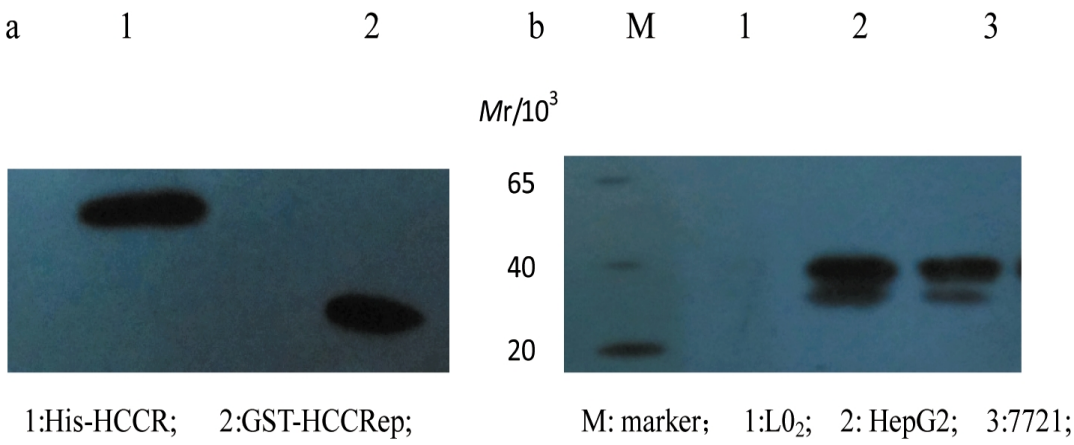


图 5 Western Blot 鉴定 HCCR 抗体的特异性

Fig.5 The specificity analysis of McAb B3 by Western Blot

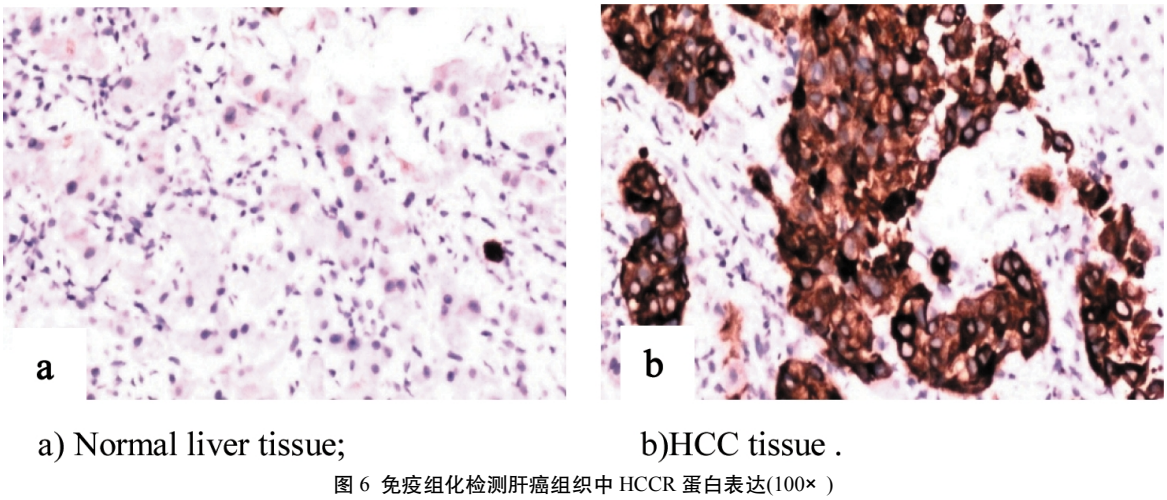


图 6 免疫组化检测肝癌组织中 HCCR 蛋白表达(100×)

Fig.6 Immunostaining of HCCR by immunohistochemistry assay with McAb B3 (100×)

表 1 肝癌患者 AFP 和 HCCR 检测结果

Table 1 The positive rate of AFP and HCCR in HCC serum samples by ELISA

Group	HCCR-	HCCR+	Total
AFP-	6	18	24
AFP+	9	27	36
Total	15	45	60

研究显示,HCCR 是作为 p53 基因的负调控因子发挥作用,其表达与 DP1、HCCRBP-1、HER2 及 P53 基因密切相关[11-12]。HCCR 可能在肿瘤发生过程中发挥着“干细胞”的作用,在多种肿瘤细胞中都高表达,如人乳腺、食管癌、淋巴、胃、结肠、卵巢等[13-15]。

HCCR 基因编码两种蛋白 HCCR-1 和 HCCR-2,HCCR-1 比 HCCR-2 多了外显子 1,它们分别含有 360aa 和 304aa,主要定位在细胞膜和胞浆中。在正常肝细胞中,它们不表达或低表达,当肝脏发生病变时,HCCR 表达上升,且胞外区被切割释放到血液中,因此检测血液中 HCCR 蛋白含量可在一定程度上评估肝脏病变状况[16]。Yoon 等[3]检测了 570 例患者血清中HCCR 蛋白表达情况,HCCR 灵敏度高达 78.2%,显著高于 α-AFP 的 64.6%;在 α-AFP 阴性患者中 HCCR 阳性率达到 76.9%;在小肝癌检测中 HCCR 阳性率达为 69.2%。此外,Jung 等[15]发现乳腺癌患者中 HCCR 灵敏度为 86.8%,而 CA15-3 的阳性率仅为 21%;在 CA15-3 阴性乳腺癌患者 HCCR 检出率高达 87.8%。王弋嘉等[17]分析了 84 例结肠癌组织、癌旁组织和正常组织中 HCCR-1 的表达情况,其中癌组织表达阳性率为 81%,癌旁组织阳性率为 38%,正常组织阳性率为 13%。有人对 1388 例肝癌患者进行 HCCR-1 和 AFP 检测,两者阳性率分别为 51%、46%,两者联合检测的阳性率为 74%[18]。上述研究表达 HCCR 很有可能成为多种肿瘤检测和治疗的靶分子。

本实验中,我们表达的 HCCR 胞外区蛋白以包涵体的形式存在,复性纯化后得到的蛋白纯度不高,可以用于动物免疫,但无法用于抗体筛选。因此我们考虑基于 HCCR 蛋白的抗原表位进行抗体的筛选[19,20]。我们将该抗原表位与 GST 蛋白融合表达,让其展示在 GST 蛋白 C 末端,通过筛选,我们成功获得了 3 株分泌 HCCR 抗体的细胞株。通过鉴定我们最终获得一株特异性和灵敏度较好的抗体。我们将该抗体初步用于肝癌患者血清 HCCR 蛋白检测,75%(30/40)的肝癌患者中检测到 HCCR 的表达,而 AFP 阳性率为 60%(24/40),两者联合阳性率达到 90%。AFP 阴性样本中 HCCR 的阳性率为 75%,说明 AFP 与 HCCR 之间有良好的互补性。目前我们检测的样本量较少,下一步我们将扩大我们的样本量,进一步分析 HCCR 作为肝癌血清诊断标志物在临床应用中的价值。

参考文献(References)

[1] 陈竺. 全国第三次死因回顾抽样调查报告[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2008
Chen Zhu. The third report of retrospective sampling survey on death in china[M]. Beijing: Peking Union Medical College press, 2008

[2] Ko J, Lee YH, Hwang SY, et al. Identification and differential expression of novel human cervical cancer oncogene HCCR-2 in human cancers and its involvement in p53 stabilization[J]. Oncogene, 2003, 22(30) : 4679-4689

[3] Yoon SK, Lim NK, Ha SA, et al. The human cervical cancer oncogene protein is a biomarker for human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5434-5441

[4] Liu Y, Li K, Ren Z, et al. Clinical implication of elevated human cervical cancer oncogene-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(7):512-520

[5] Zhang G, Ha SA, Kim HK, et al. Combined analysis of AFP and HCC-R-1 as an useful serological marker for small hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study[J]. Dis Markers, 2012, 32(4):265-271

[6] Gomaa AI, Khan SA, Leen EL, et al. Diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(11):1301-1314

[7] Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, et al. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(7):1299-1305

[8] Saffroy R, Pham P, Reffas M, et al. New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(9):1169-1179

[9] Piotr S, Janusz C, Alicja WD. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatcocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(4): 418-424

[10] Cho GW, Shin SM, Namkoong H, K et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates the HCCR-1 oncogene expression[J]. Gene, 2006, 384:18-26

[11] Ha SA, Shin SM, Lee YJ, et al. HCCRBP-1 directly interacting with HCCR-1 induces tumorigenesis through P53 stabilization [J]. Int J Cancer, 2008, 122(3):501-508

[12] Ha SA, Shin S, Kim H, et al. Oncoprotein HCCR-1 expression in breast cancer is well correlated with known breast cancer prognostic factors including the HER2 level, p53 mutation, and ER/PR expression [J]. BMC Cancer, 2009, 9(1):51

[13] Chung Y J, Kim J W. Novel oncogene HCCR: its diagnostic and therapeutic implications for cancer [J]. Histol Histopathol, 2005, 20 (3):999

[14] Liu Y, Li K, Ren Z, et al. Clinical implication of elevated human cervical cancer oncogene-1 expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(7):512-520

[15] Jung SS, Park HS, Lee IJ, et al. The HCCR oncoprotein as a biomarker for human breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(21):7700-7708

[16] Jirun P, Zhang G, Ha SA, et al. HCCR-1 for detecting small hepatocellular carcinoma latent in a cirrhotic liver: a prospective cohort study [J]. Gut, 2012, 61(10):1514-1515

[17] 王弋嘉, 唐涛, 崔宇, 等. 人宫颈癌癌基因在结肠癌中诊断价值的研究[J]. 中国癌症杂志, 2010, 10:796-798

(下转第 3235 页)

增殖与侵袭[19]。

本实验的结果显示,通过 ADAR1-shRNA 干扰胶质瘤 U87 细胞后,使细胞内 ADAR1(P110)的表达明显下降,且细胞增殖明显下降,细胞凋亡明显增多,表明 ADAR1 有促进胶质瘤细胞增殖以及抑制其凋亡的能力,但其发挥作用的具体途径是与 ADAR2 形成的异二聚体相关,或是与 ADAR1 通过干预 miRNA 的合成[20],尚待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明通过 shRNA 抑制 ADAR1 的表达能明显促进人胶质瘤细胞 U87 细胞的凋亡并抑制其增殖,ADAR1 基因可能成为治疗治疗胶质瘤的新靶点,针对 ADAR1 基因的干涉技术有望成为胶质瘤基因治疗的新途径。

参考文献(References)

[1] Deorah, S. et al, Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001 [J]. Neurosurg Focus, 2006, 20(4): E1

[2] Dolecek, T.A., et al., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009 [J]. Neuro Oncol, 2012,14 Suppl 5: 1-49

[3] Ricard, D, et al. Primary brain tumours in adults [J]. Lancet, 2012, 379 (9830): 1984-1996

[4] Weier, H. U. et al. The interferon-inducible, double-stranded RNA-sp-ecific adenosine deaminase gene (DSRAD) maps to human chromosome 1q21.1-21.2 [J]. Genomics, 1995, 30(2): 372-375

[5] Reenan, R. A. Molecular determinants and guided evolution of species-specific RNA editing [J]. Nature, 2005, 434(7031): 409-413

[6] Davis, F. G. et al. Issues of diagnostic review in brain tumor studies: from the Brain Tumor Epidemiology Consortium[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(3): 484-489

[7] Gladson, C.L. R.A. Prayson, and W. M. Liu, The pathobiology of glioma tumors [J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 33-50

[8] Hou, W.G. et al. Genetic variation in the EGFR gene and the risk of glioma in a Chinese Han population [J] . PLoS One, 2012, 7(5): 25

[9] Keegan, L. P. A. Gallo, and M. A. O'Connell, The many roles of an RNA editor[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(11): 869-878

[10] Ma, C.H. et al. Abnormal expression of ADAR1 isoforms in Chinese pediatric acute leukemias [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 406(2): 245-251

[11] Galeano, F. et al. ADAR2-editing activity inhibits glioblastoma growth through the modulation of the CDC14B/Skp2/p21/p27 axis [J]. Oncogene, 2013, 32(8): 998-1009

[12] Tariq, A. et al. RNA-interacting proteins act as site-specific repressors of ADAR2-mediated RNA editing and fluctuate upon n euronal stimulation[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(4): 2581-2593

[13] Tomaselli, S. et al. ADAR2 editing activity in newly diagnosed versus relapsed pediatric high-grade astrocytomas [J]. BMC Cancer, 2013,13(255): 1471-2407

[14] Maas, S. et al. Undererediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98 (25): 14687-14692

[15] Cenci, C. et al. Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation [J]. J Biol Chem, 2008, 283(11): 7251-7260

[16] Schmauss, C. et al. The roles of phospholipase C activation and alternative ADAR1 and ADAR2 pre-mRNA splicing in modulating serotonin 2C-receptor editing in vivo[J]. Rna, 2010, 16(9): 1779-1785

[17] Witman, N.M. et al. ADAR-Related Activation of Adenosine-to-Inosine RNA Editing During Regeneration [J]. Stem Cells Dev, 2013,22 (16): 2254-2267

[18] Yang, Y. X. Zhou, and Y. Jin, ADAR-mediated RNA editing in non-coding RNA sequences [J]. Sci China Life Sci, 2013, 5: 5

[19] Hideyama, T. et al. Co-occurrence of TDP-43 mislocalization with reduced activity of an RNA editing enzyme, ADAR2, in aged mouse motor neurons[J]. PLoS One, 2012,7(8): 20

[20] Nishikura, K, et al. Antagonistic and stimulative roles of ADAR1 in RNA silencing: An editor's point-of-view [J]. RNA Biol, 2013, 10: 8

(上接第 3215 页)

Wang Yi-jia, Tang Tao, Cui Yu, et al. The diagnostic value of human cervical cancer oncogene in colon tumor [J]. China Oncology, 2010, 10:796-798

[18] Zhang G, Ha SA, Kim HK, et al. Combined analysis of AFP and HCCR-1 as an useful serological marker for small hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study [J]. Dis Markers, 2012,32 (4): 265-271

[19] 刘保才, 霍景瑞, 刘英富, 等. 肝癌候选标志物 HCCR 单克隆抗体的制备和鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 10:1094-1097 +1102

Liu Bao-cai, Huo Jing-rui, Liu Ying-fu, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody against HCCR protein [J]. Journal of Cellular and Molecular Zmmunology, 2011, 27 (10):1094-1097 +1102

[20] 周游, 吴峰, 范国才, 等. 基于 B 细胞表位制备抗肝细胞生成素的抗体[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(10):761-763

Zhou You, Wu Feng, Fan Guo-cai, et al. Generation of antibody against hepatopoietin based on B cell epitopes[J]. Letters In Biotechnology, 2009, 20(10):761-763