

## B7-2 基因工程抗体的制备及 体内外抗 B 淋巴瘤作用研究\*

刘玉华, 孙 杰, 陈明心, 郭静雅, 胡玲玲, 王艳茹,  
陈昌友, 高增燕, 朱晓燕, 邱玉华  
(苏州大学医学部免疫学系, 江苏 苏州 215123)

**摘 要:** 构建 B7-2 人-鼠嵌合抗体基因表达质粒 pIRES/ch3C8, 经脂质体法转染真核表达细胞株 CHO 制备 B7-2 人-鼠嵌合抗体(命名为 ch3C8)。该抗体能够识别人恶性 B 淋巴瘤细胞株 Raji 表面的 B7-2 分子并诱导其凋亡。ch3C8 结构中来源于人 Ig 的 Fc 段可介导高效的 ADCC 及 CDC 效应。经 ch3C8 结合的 Raji 细胞接种于 BALB/c 裸鼠后的致瘤性消失。该抗体在 B7-2 相关肿瘤的生物治疗中具有潜在的应用价值。

**关键词:** B7-2; 嵌合抗体; 淋巴瘤; 凋亡; ADCC 效应; CDC 效应

**中图分类号:** R392.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2010)03-0107-06

### Preparation of B7-2 Genetic Engineering Antibody and Studying of Anti-B lymphoma Effect *in vivo* and *in vitro*

LIU Yuhua, SUN Jie, CHEN Mingxin, GUO Jingya, HU Lingling, WANG Yanru,  
CHEN Changyou, GAO Zengyan, ZHU Xiaoxian, QIU Yuhua  
(Immunology Department of Basic Medical Science and Biological Science Institute,  
Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** Gene expression plasmid pIRES/ch3C8 of B7-2 human-mouse chimeric antibody was constructed, eukaryotic cell line CHO was transfected with pIRES/ch3C8 by liposome method, and prepared B7-2 human-mouse chimeric antibody (named ch3C8). It could recognize B7-2 molecule on Raji, which is a human malignant B lymphoma cell line, and induce apoptosis of Raji. In addition, the ADCC and CDC effect was effectively mediated with the Fc fragment of the ch3C8 which come from human Ig. It was further showed that Raji lost oncogenicity with ch3C8 treated, which inoculated BALB/c nude mouse. ch3C8 will have a potential application value on B7-2 related tumor biotherapy.

**Key words:** B7-2; chimeric antibody; lymphoma; apoptosis; ADCC effect; CDC effect

B7-2 (CD86) 是介导 T 细胞活化所需的协同刺激信号分子之一<sup>[1]</sup>, 属免疫球蛋白超家族, 以单体形式表达于抗原递呈细胞 (APCs), 如 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞 (DC) 等<sup>[2]</sup>, 也可以可溶性形式存在于体液中<sup>[3]</sup>。膜表面 B7-2 分子与 T 细胞表面受体分子 CD28 及 CTLA-4 结合发挥效应。人恶性 B 淋巴瘤细胞天然

高表达 B7-2 分子, 该分子与肿瘤的形成及转移密切相关, 应用抗体作用于该分子可发挥抗肿瘤效应<sup>[4]</sup>。同时有研究发现, B7-1 分子在该肿瘤细胞上也高表达<sup>[5]</sup>, 联合应用抗 B7-1 抗体能发挥协同的抗肿瘤作用。由于嵌合抗体的体内应用具有诸多优势, 如减少人抗鼠抗体 (human anti-mouse antibody, HAMA) 的产生<sup>[6]</sup>, 体内半衰期长, 嵌合

\* 收稿日期: 2009-03-26

基金项目: 科技部“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09103-705)

作者简介: 刘玉华 (1980 年生), 女, 硕士; 通讯作者: 邱玉华; E-mail: qyh820@126.com

抗体的 Fab 段仍具有良好的抗原结合能力,经人源化改造的 Fc 段能更好的介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 及补体依赖的细胞介导的细胞毒效应 (complement-dependent cell-mediated cytotoxicity, CDC)<sup>[7]</sup>,故本研究运用细胞杂交及基因工程技术等,在成功构建了 B7-2 人-鼠嵌合抗体基因表达质粒 pIRES/ch3C8 的基础上,制备嵌合抗体 ch3C8,并探讨该抗体体外对高表达 B7-2 分子的 Raji 细胞的诱导凋亡及杀伤效应<sup>[8]</sup>,以及 BALB/c 裸鼠体内的抗癌作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验试剂、仪器、细胞株及动物

少量质粒抽提试剂盒 (V-gene, 美国); 脂质体 LipofectAMIN 试剂盒 (Invitrogen, 美国); pIRES/ch3C8 表达质粒、鼠抗人 B7-2mAb (3C8) 及抗人 B7-1 嵌合抗体 (ch4E5) 均由本科室自行研制; PE 标记的羊抗人 IgG (Fc) 二抗、PE 标记的羊抗鼠 IgG (Fc) 二抗、Annexin V 凋亡试剂盒 (R&D, 美国); MTT (Sigma, 美国); RPMI1640 基础培养基 (Gibco, USA); CO<sub>2</sub> 培养箱、离心机 (Jouan, 法国); 倒置显微镜 (Olympus, 日本); 流式细胞仪 (Beckman-Coulter, 美国); 550 型酶标仪 (Bio-rad, 美国); L929-B7-2 本室构建, Raji 和 Daudi (人恶性 B 淋巴瘤细胞株)、Jurkat (人恶性 T 淋巴瘤细胞株)、CHO (中国仓鼠卵巢细胞)、293T (ATCC, 美国); BALB/c 裸鼠 (上海斯耐克动物中心, 中国)。

### 1.2 ch3C8 在 293T 细胞中的瞬时表达及鉴定

选择生长良好的 293T 细胞,用 1640 完全培养基调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/mL,加入六孔培养板中。当细胞铺满培养孔底面积 75% 左右时,将抽提的重组质粒 20  $\mu$ g、脂质体 8  $\mu$ L 分别与无血清 1640 培养基 150  $\mu$ L 混合,室温静置 20 min 后加入 293T 细胞中,分别于转染后 24、48 及 72 h 收集培养上清 (同时设转染空质粒 pIRES 的对照组)。将生长状态良好的 L929-B7-2 基因转染细胞用 PBS 洗涤 (以 L929-mock 作为对照),  $1 \times 10^5$ /100  $\mu$ L/管。分别加入 100  $\mu$ L 上述收集的培养上清,4  $^{\circ}$ C 反应 45 min, PBS 洗涤后加入羊抗人 IgG (Fc)-PE, 4  $^{\circ}$ C 反应 30 min, PBS 洗涤 2 次,用流式细胞仪分析。同时以 293T-mock 培养上清作为阴性对照,以鼠源性的亲本抗体作为阳性对照。

### 1.3 ch3C8 在 CHO 细胞中的稳定表达及鉴定

将抽提的重组表达质粒,同法 (1.2) 转染 CHO 细胞,同时设转染空质粒 pIRES 的 CHO 细胞为对照。以流式细胞术 (同 1.2) 检测细胞培养上清中表达产物与 L929-B7-2 基因转染细胞的结合率。以 3C8 为阳性对照。对阳性转染细胞进行 G418 加压以及亚克隆筛选。

### 1.4 ch3C8 的 Protein G 亲和层析柱分离纯化及定量

调整 CHO-ch3C8 基因转染细胞浓度至  $3 \times 10^5$  个/mL,培养 4 d 后,更换无血清培养基继续培养,5 d 后收集培养上清,经超滤浓缩后,采用 Protein G 亲和层析柱分离纯化,Lowy 法定量。

### 1.5 ch3C8 对 Raji 细胞膜表面 B7-2 分子的识别

收集生长良好的 Raji、Daudi 及 Jurkat 细胞,用 PBS 洗涤后置于流式分析管,  $1 \times 10^5$  个/管 (100  $\mu$ L), 分别加入 ch3C8, 1  $\mu$ g/管, 4  $^{\circ}$ C 反应 45 min, PBS 洗涤,加入羊抗人 IgG-PE 二抗, 4  $^{\circ}$ C 反应 30 min, PBS 洗涤 2 次,经流式细胞仪进行分析。同时以鼠源性亲本抗体 3C8 及人同型 IgG1 作对照,以 L929-B7-2 细胞作细胞株的阳性对照, Jurkat 细胞作阴性对照。

### 1.6 ch3C8 诱导 Raji 细胞凋亡作用分析

选择生长良好的 Raji 细胞,调整细胞密度至  $1 \times 10^7$  个/mL,加于 96 孔板, 100  $\mu$ L/孔,分别加入抗人 B7-2 人-鼠嵌合抗体 (ch3C8)、抗人 B7-2 人-鼠嵌合抗体联合抗人 B7-1 嵌合抗体 (ch3C8 + ch4E5) 及鼠抗人 B7-2 单抗 (3C8), 抗体终质量浓度为 10  $\mu$ g/mL。抗体联合应用组总量不变,等量组合。同时设置了人 IgG1 同型对照组,每组 3 个复孔。37  $^{\circ}$ C 培养 24 h,收集细胞置流式管,冷 PBS 洗涤 2 次,重悬于 Annexin V 孵育液中 (10  $\times$  buffer 10  $\mu$ L, PI10  $\mu$ L, Annexin V 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 79  $\mu$ L) 100  $\mu$ L/管,室温避光孵育 15 min,分别加入 1  $\times$  结合缓冲液 400  $\mu$ L/管。1 h 内经流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 1.7 ch3C8 介导 PBMC 对 Raji 细胞的 ADCC 效应分析

将健康人新鲜抗凝外周血,常规 Ficoll 密度梯度分离法获得 PBMC 作为效应细胞,铺于 96 孔板,每孔 50  $\mu$ L,  $2 \times 10^5$  个/孔;按效靶比例 20:1,选择生长良好的 Raji 细胞作为靶细胞,每孔 50  $\mu$ L,  $1 \times 10^4$  个/孔,加入终质量浓度为 10  $\mu$ g/mL 的 ch3C8,低速离心 400 r/min 3 min,使效靶细胞充分接触。设置鼠源性亲本抗体对照组以及人 IgG1 同型对照组以及阴性对照组,每组设立 3 个复孔。

分别于 37 °C 培养 4、24、48 及 72 h, 加入 MTT (5 mg/mL) 溶液, 10  $\mu$ L/孔, 继续培养 6 h, 加入 DMSO, 50  $\mu$ L/孔, 终止反应, 用酶联检测仪测定  $A_{570}$  值。杀伤率 (%) = [1 - (实验组 A 值/对照组 A 值)]  $\times$  100%。

### 1.8 ch3C8 介导的 CDC 效应分析

选择生长良好的 Raji 细胞作为靶细胞, 加入 96 孔板, 每孔 50  $\mu$ L,  $1 \times 10^4$  个/孔, 加入终质量浓度为 10  $\mu$ g/mL 的抗 B7-2 人-鼠嵌合抗体 ch3C8, 在所加抗体组加入 4 倍稀释的人血清 50  $\mu$ L (作为补体来源), 同时设置抗 B7-2 鼠源性抗体对照组, 人同型 IgG1 对照组及阴性对照组, 分别于 4、24、48 及 72 h 用 MTT 法 (同 1.7) 测定  $A_{570}$  值。杀伤率 (%) = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值  $\times$  100%。

### 1.9 ch3C8 对 Raji 细胞体内致瘤的抑制作用研究

选择 6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠, 随机分为 3 组, 10 只/组, SPF 条件下饲养。A 组: 单纯接种 Raji 细胞组; B 组: Raji + ch3C8 组; C 组: Raji + 3C8 组。收集生长良好的 Raji 细胞, A 组: Raji  $1 \times 10^7$ /只, 200  $\mu$ L/只, B、C 组: 按抗体 50  $\mu$ g/200  $\mu$ L 与上述量 Raji 细胞体外混合, 室温反应 30 min 后接种, 接种部位左腋下, 逐日观察肿瘤形成时间、成瘤率、肿瘤大小及裸鼠生存状态等指标。

### 1.10 统计学分析方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示, 组间比较采用单、双因素方差分析, 检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ch3C8 的瞬时表达及鉴定

脂质体法将质粒 pIRES/ch3C8 转染 293T 细胞, 在转染后 24、48 及 72 h 时收集培养上清, 经流式细胞术分析, 与 L929-B7-2 基因转染细胞的阳性结合率分别为 25.6%、76.3% 及 95.6%。

### 2.2 ch3C8 的稳定表达及鉴定

B7-2 嵌合抗体表达质粒 pIRES/ch3C8 经脂质体法转染真核细胞株 CHO, 分别于转染后 24、48 及 72 h 时收集培养上清, 经流式细胞术分析, 与 L929-B7-2 基因转染细胞的阳性结合率为 27.8%、80.9% 和 96.6%, CHO 及 CHO-mock 细胞上清中均无 ch3C8 表达, 而鼠源性亲本抗体 3C8 与 L929-B7-2 的阳性结合率 98.2% (图 1)。对阳性转染孔细胞, 用 G418 药物按浓度梯度加压筛选 2 周 (终质量浓度为 500~800  $\mu$ g/mL), 并亚克隆后获得稳定高效分泌嵌合抗体的基因转染细胞株, 命名为 CHO-ch3C8。

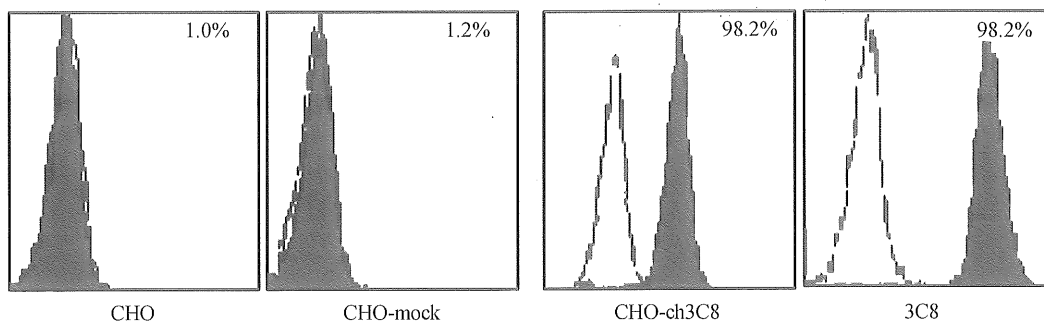


图 1 ch3C8 稳定表达的流式细胞术分析

Fig. 1 Steady expression of ch3C8 by FCM

### 2.3 ch3C8 分离纯化

收获 CHO-ch3C8 细胞的大批量无血清培养上清, 超滤浓缩后, 经 Protein G 亲和层析柱分离纯化, 获得纯化嵌合抗体, Lowy 法定量, 从培养上清中获取的嵌合抗体 ch3C8 得率为 3.12 mg/L (图 2)。

### 2.4 ch3C8 对细胞表面 B7-2 分子的识别

经流式细胞术检测, ch3C8 与 L929-B7-2、Raji、Daudi 及 Jurkat 细胞的阳性结合率分别为 98.5%、97.2%、96.3% 及 2.3%。与鼠源亲本抗

体 3C8 阳性结合率 (分别为 99.6%、98.9%、98.2% 及 2.1%) 相当 (图 3)。

### 2.5 ch3C8 诱导 Raji 细胞的凋亡作用

流式细胞术分析结果显示, 与 ch3C8 共培养 24 h 的 Raji 细胞凋亡率是 12.21%, 联合 B7-1 嵌合抗体 ch4E5, 凋亡率为 22.75%, 亲本抗体 3C8 组的凋亡率是 12.44% (图 4)。

### 2.6 ch3C8 介导的 ADCC 效应

MTT 法分析结果显示, 在效靶混合细胞中加

入 ch3C8 共培养 4、24、48 及 72 h, PBMC 对 Raji 细胞的杀伤率分别为 25.90%、54.30%、73.00% 及 76.60%。而对照组鼠源亲本抗体 3C8 介导 AD-CC 效应 4 h 时尚未发生, 24 h 杀伤效应达高峰 (杀伤率仅为 30.00%)。ch3C8 介导的杀伤效应明显高于鼠源亲本抗体及 IgG1 同型对照组 (图 5), 均具统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.7 ch3C8 介导的 CDC 效应

MTT 法检测发现, ch3C8 可介导 CDC 作用。4、24、48 及 72 h 的杀伤率分别为 39.41%、54.62%、60.32% 及 66.09%。亲本抗体组对应的杀伤率分别为: 18.25%、35.29%、32.54% 及 9.82%, ch3C8 组与 3C8 组及人同型 IgG1 对照组比较均有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (见表 1)。

### 2.8 ch3C8 对 Raji 细胞体内致瘤的抑制作用

将 ch3C8 与 Raji 细胞体外混合反应后, 皮下接种 BALB/c 裸鼠, 逐日观察发现, 经抗体处理组, 70 d 内未见成瘤, 裸鼠存活, 状态良好。未经

抗体处理组接种第 30 天形成肉眼可见的肿瘤结节, 平均直径 3.0 mm, 成瘤率约 70%, 70 d 肿瘤平均直径 13.0 mm, 部分裸鼠死亡; 结果提示, ch3C8 体外作用后的 Raji 细胞致瘤性消失 (见图 6)。

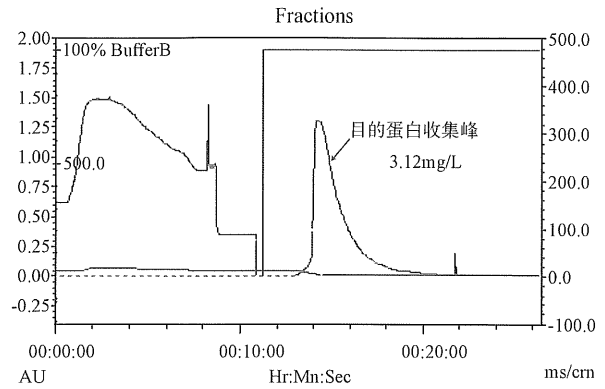


图 2 Protein G 免疫亲和层析法纯化的洗脱曲线  
Fig. 2 Purification of ch3C8 by Protein G affinity chromatography

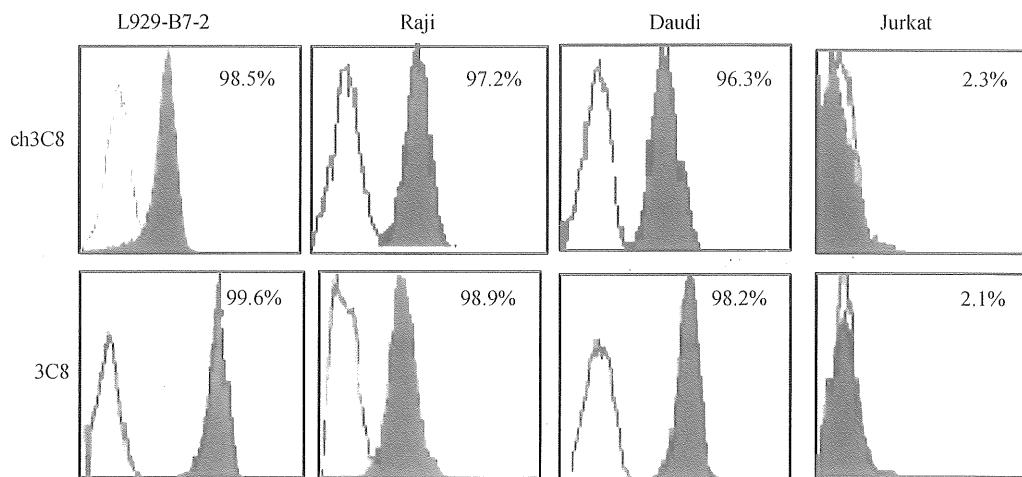


图 3 ch3C8 对细胞表面 B7-2 分子的识别  
Fig. 3 The recognition of ch3C8 to B7-2 molecule of cell surface

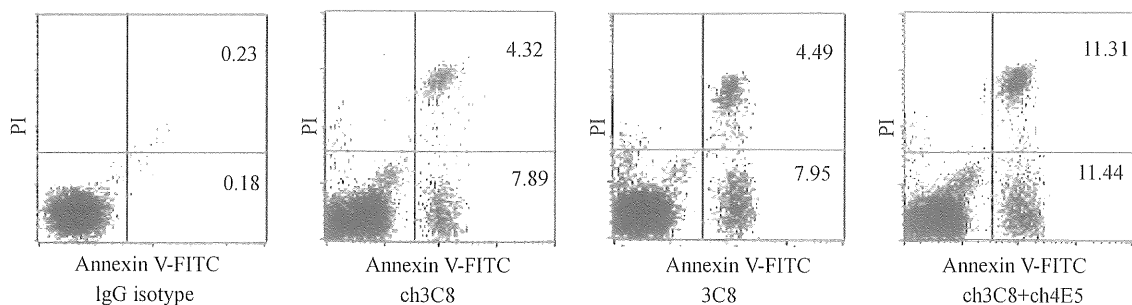


图 4 ch3C8 诱导的 Raji 细胞凋亡  
Fig. 4 ch3C8 induced apoptosis of Raji cell

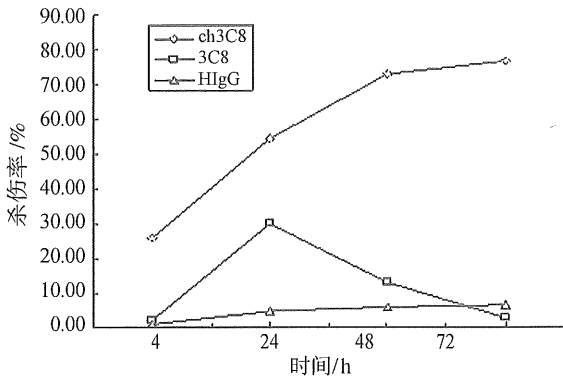


图 5 嵌合抗体 ch3C8 介导的 ADCC 作用

Fig. 5 ADCC effect was mediated by ch3C8

ch3C8 与 3C8 组比较:  $P=0.007$ ;  
ch3C8 与 HIgG 组比较:  $P=0.003$ .

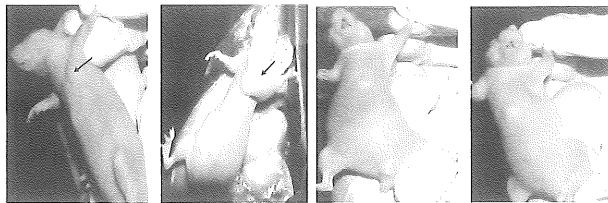
表 1 ch3C8 介导的 CDC 效应

Table 1 CDC effect was mediated by ch3C8

	$\bar{X} \pm S$	F 值	P 值
ch3C8	0.563 ± 0.191		
3C8	0.938 ± 0.157		
HIgG	1.235 ± 0.107	193.58	0.001

Levene 方差齐性检验,  $F$  值 = 0.56,  $P=0.589 > 0.05$ , 方差是齐的。

ch3C8 与 3C8 组比较,  $P=0.005 < 0.05$ , ch3C8 与 HIgG1 组比较,  $P=0.000 < 0.05$ 。



接种Raji 30 d 接种Raji 70 d 接种Raji+ch3C8 接种Raji+3C8

图 6 ch3C8 对 Raji 体内致瘤的抑制作用

Fig. 6 Inhibit Raji oncogenicity of ch3C8 in nude mouse

### 3 讨论

目前, 抗体在临床疾病中的应用越来越广泛, 抗体可以直接发挥活化或者阻断信号作用, 也可与某些化疗或放疗药物联合应用间接发挥作用。采用基因工程技术制备的人-鼠嵌合抗体, 其鼠源蛋白的含量可减少 60% ~ 70%, 进入人体后的免疫原性大大降低, 明显减少 HAMA 的产生, 体内半衰期可由鼠源性抗体的 1.5 d 延长至 10 d 之久<sup>[9]</sup>。同时嵌合抗体中来源于人 Ig 的 Fc 段可介导高效的 ADCC 及 CDC 效应<sup>[10]</sup>。

本研究在成功构建 B7-2 人-鼠嵌合抗体基因表达质粒 pIRES/ch3C8 的基础上, 采用脂质体转染法<sup>[11]</sup>, 获取了稳定表达目的抗体的 CHO 真核表达细胞系。该体系具有外源目的蛋白易在细胞中合成、修饰及分泌到胞外等优点, 因此 CHO 被广泛应用于基因工程抗体的表达<sup>[12]</sup>。

在采用大规模无血清培养, 免疫亲和层析纯化获取 B7-2 嵌合抗体 ch3C8 的基础上, 首先采用流式细胞术分析了其对 Raji 细胞膜表面 B7-2 分子的识别, 阳性结合率为 97.2%, 与亲本抗体的阳性结合率 98.9% 相当。提示改造后的嵌合抗体仍保留了良好的结合抗原的能力。进而将 ch3C8 加入到 Raji 细胞中共培养, 经 MTT 法分析, 该抗体诱导肿瘤细胞的凋亡率为 12.21%, 联合 B7-1 人-鼠嵌合抗体 ch4E5, 肿瘤细胞凋亡率为 22.75%。提示两种抗体联合应用可发挥协同作用<sup>[13]</sup>。

关于嵌合抗体 ch3C8 结构中来源于人 IgFc 段介导的 ADCC 效应, 本研究以 PBMC 为效应细胞, Raji 为靶细胞, 经 ch3C8 处理 4、24、48 及 72 h 时, 对 Raji 细胞的杀伤率分别为 25.90%、54.30%、73.00% 及 76.60%。而亲本抗体对照组, 在作用 4 h 时尚未发生 ADCC 效应, 24 h 的最大杀伤率仅为 30.00%, 随后迅速下降。提示嵌合抗体中人源 Fc 段与人效应细胞 Fc 受体可发生高亲和力的持久结合<sup>[9]</sup>。有关 ch3C8Fc 段中补体结合片段介导的 CDC 效应, 本研究以 4 倍稀释的人血清作为补体来源, Raji 为靶细胞, 经 ch3C8 处理 4、24、48 及 72 h 时, 对 Raji 细胞的杀伤率分别为 39.41%、54.62%、60.32% 及 66.09%, 明显高于亲本抗体 3C8 介导的 CDC 效应。提示嵌合抗体中人源的 Fc 段能与入血清补体更好的结合<sup>[14]</sup>。

在上述体外研究的基础上, 选取天然高表达 B7-2 分子的 Raji 细胞与 ch3C8 共抚育, 然后接种于 BALB/c 裸鼠, 从而进一步分析 ch3C8 的体内抑瘤作用。在 70 d 的连续观察期间, 经 ch3C8 处理的 Raji 细胞组, 均未见肿瘤结节形成, 小鼠状态良好, 无死亡。其致瘤性完全消失。未经抗体处理的对照组, 接种第 30 天形成肉眼可见的肿瘤结节, 平均直径 3.0 mm, 成瘤率约 70%, 70 d 肿瘤平均直径 13.0 mm, 部分小鼠死亡。

本研究获取的 B7-2 人-鼠嵌合抗体对 B7-2 分子相关的肿瘤具有抗瘤效应。

## 参考文献:

- [1] 张志方, 张春艳, 杨岫岩, 等. SLE 患者外周血淋巴细胞表达 BlyS 和 CD86 的变化[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2002, 41(5): 126 - 127.
- [2] ERIC L D, DANETT K B, KEITH W K, et al. IL-4-dependent CD86 expression requires JAK/STAT6 activation and is negatively regulated by PKC $\delta$ [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(2): 271 - 280.
- [3] SHUMIN Y, KAREN S S, TIM P, et al. Novel transcripts encoding secreted forms of feline CD80 and CD86 costimulatory molecules [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001, 81(1-2): 15 - 21.
- [4] PAGESLAURENCE C, JOËL P, MARIE C J, et al. Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas[J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(3): 479 - 488.
- [5] LAURENCE C, JOËL P, MARIE-CHRISTINE J, et al. Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas[J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(3): 479 - 488.
- [6] 胡玲玲, 徐耀瑜, 陈永井, 等. 抗人 CD86 人-鼠嵌合抗体的构建及在 CHO 细胞的表达[J]. *现代免疫学*, 2008, 28(2): 104 - 109.
- [7] WEI W, YASUHIKO N, SHUJI O, et al. Chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells[J]. *Lung Cancer*, 2009, 63(1): 23 - 31.
- [8] JOSETTE C, RHONA S, ZHENGXING Q, et al. Epratuzumab, a CD22-targeting recombinant humanized antibody with a different mode of action from rituximab[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(6): 1331 - 1341.
- [9] GREEN M C, MURRAY J L, HORTOBAGYI G N. Monoclonal antibody therapy for solid tumors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2000, 26(4): 269 - 286.
- [10] KIYOTAKA N, TETSURO O, JUNICHI N, et al. Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(2): 279 - 284.
- [11] LEI Y, ESA W, HUSNAIN K, et al. Cationic liposome mediated VEGF<sub>165</sub> transfection with skeletal myoblasts [J]. *Heart Lung*, 2007, 16: 25.
- [12] ANTHONY J J, RANGA N P, LATHA K P, et al. Stable expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoforms by CHO cells[J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 326(1/2): 113 - 122.
- [13] ANGELA H, MASUYUKI N, ERWIN G. 318 Costimulation by CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) induce comparable Jun kinase expression and T cell activation but show differential susceptibility to antibody treatment in allergic responses in vitro[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105(1): S107.
- [14] ZEPINGN Z, RENCHI Y. Rituximab treatment for chronic refractory idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 65(1): 21 - 31.