

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.004

重组早孕因子与天然早孕因子的免疫交叉反应*

李爱美 练玉银 王家骥[△]

(广州医科大学公共卫生学院 广东 广州 510182)

摘要 目的:探讨细胞表达的重组早孕因子(CHO-EPF)、大肠杆菌表达的重组早孕因子(BL21-EPF)和天然早孕因子(Native Early Pregnancy Factor, nEPF)之间的免疫交叉反应,寻找制备 EPF 抗体比较理想的免疫原。**方法:**采用 CHO-EPF、nEPF 作为免疫原分别免疫 BALB/c 小鼠,制备 CHO-EPF 多抗和 nEPF 多抗;结合本实验室储备的 BL21-EPF 鼠单克隆抗体,运用 SDS-PAGE、Western blotting 及 ELISA 等方法对 nEPF、CHO-EPF、BL21-EPF 之间的免疫交叉反应进行检测。**结果:**三种来源的 EPF 诱导抗体的效价比较无显著性差异。原核表达 BL21-EPF 与 nEPF 诱导的抗体中 BL21-EPF 单抗能识别 nEPF 中 26 ku 和 52 ku 组分,且抗 nEPF 多抗也能与 BL21-EPF 中 10 ku 组分反应;真核表达 CHO-EPF 与 nEPF 诱导的抗体中 CHO-EPF 多抗能识别 nEPF 中 10 ku 和 26 ku 组分,而 nEPF 抗体不能与 CHO-EPF 反应;原核表达 BL21-EPF 与真核表达 CHO-EPF 诱导的抗体中 CHO-EPF 多抗能识别 BL21-EPF 中 10 ku 片段,而 BL21-EPF 单抗不能与 CHO-EPF 反应。**结论:**真核源性 CHO-EPF、原核源性 BL21-EPF、人源性 nEPF 之间存在一定的交叉反应,在抗体制备过程中用 rEPF 替代 nEPF 作为免疫原是可行的。

关键词:早孕因子;重组;天然;免疫交叉反应

中图分类号:R-33; Q132.7; R392 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)04-616-05

The Cross Reaction of the Recombinant Early Pregnancy Factor and the Native Early Pregnancy Factor*

LI Ai-mei, LIAN Yu-yin, WANG Jia-ji[△]

(School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510182, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of EPF from different sources on antibody titers and the cross reaction between antibodies, and to clarify whether rEPF can replace human EPF as immunogen in the preparation of EPF antibody. **Methods:** Using the antigens which prepared with three kinds of different methods to immunize BALB/c mice. 3 kinds of antibodies, anti-CHO-EPF, BL21-EPF and nEPF were produced, determine their titer and the optimal antigen antibody concentration. The immunogenicity of EPF from different sources was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis, Western blotting and ELISA. **Results:** Interaction experiments showed that the antibodies prepared from three kinds of EPF can identify native EPF. CHO-EPF antibodies recognize BL21-EPF and native EPF, but neither BL21-EPF nor native EPF antibodies do not recognize CHO-EPF. No significant difference in the titer of EPF antibody between the three sources. **Conclusion:** This study shows that eukaryotic EPF, prokaryotic EPF and human EPF have similar structures and slight differences. The antibody titers of EPFs vary from one source to another and there is a certain cross reaction between antibodies. And it is possible to demonstrate that it is feasible to replace nEPF as an immunogen with rEPF during EPF antibody preparation.

Key words: EPF; Recombination; Native; Cross reaction

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q132.7; R392 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)04-616-05

前言

早孕因子是哺乳动物妊娠早期母体血清中最早出现的一种免疫抑制因子^[1],对温度和酸碱度的耐受性较强,当低于 56℃ 时很稳定,一旦超过 72℃ 时容易失活,对胰蛋白酶、酸性 pH、有机溶剂、十二烷基硫酸钠敏感,还原剂二硫苏糖醇稳定^[2]。生物信息学分析显示 nEPF 有 N 端乙酰化,有 4 个 α 螺旋,7 个 β 折叠,2 个糖基化位点^[3]。nEPF 是用纯化的方法^[4-8]从人^[9]、

猪^[10]、牛^[1,11]、羊^[12]、血小板^[13]、癌细胞^[14-16]、鼠胚胎培养基^[17,18]等生物标本提取而来。重组 EPF(rEPF)是指运用分子克隆技术表达的蛋白,nEPF 与 rEPF 是空间结构相当类似的蛋白质^[2,19,20]。虽是表达同一 EPF 基因,不同体系表达的 rEPF 之间及与 nEPF 在高级结构上仍有一定区别^[21,22],这种结构差异极有可能导致免疫时抗原表位缺失或不一致^[23]。蛋白翻译后修饰对于保持其中和表位完整性尤为重要。为了有效地检测 rEPF 的表达情况以及相互之间的免疫交叉反应,本研究分别制备了 CHO-EPF

* 基金项目:广东省中医药局科研项目(20162101);广州市教育科学规划课题(1201533519)

作者简介:李爱美,硕士研究生,主要从事卫生毒理学与健康管理工作

[△] 通讯作者:王家骥,二级教授,E-mail: wjiaji@163.com

(收稿日期:2017-05-13 接受日期:2017-06-08)

多抗、BL21-EPF 单抗、nEPF 多抗,并用酶联免疫吸附(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)试验测定了效价,运用 SDS-PAGE、Western blotting 及 ELISA 等方法对 nEPF、CHO-EPF、BL21-EPF 进行检测,鉴别三种来源的蛋白免疫原性差异,确定可用于制备用于检测的抗体一类重组蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

重组表达体系 CHO-pcDNA4.0-EPF, BL21-pET28b-EPF 为本实验室前期构建; OptiPRO™SFM(1×), FreeStyle Max Transfection Reagent 购自 Invitrogen 公司; Endo-free Plasmid Maxi Kit 购自 AXYGENT 公司; Free style expression medium (8 mM L-glutamine) 购自 GIBCO 公司; BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心; Freund's Adjuvant, complete (F5881)/incomplete (F5506) 购自 SIGMA 公司; 电泳仪购自 Bio-Rad 公司; 普通酶标仪购自 Thermo 公司; 快速蛋白液相色谱仪购自 GE 公司; 超声波细胞破碎乳化仪购自 Thermo 公司; 盐酸、甲醇、冰醋酸、Tris、甘氨酸、过硫酸铵、SDS、TEMED、丙烯酰胺、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5×)、PageRuler Prestained Protein Ladder (26616)、BCA 试剂盒、TMB 显色液 (ELISA HRP 显色用) 等均购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司; Mouse monoclonal [4D11] to 6× His tag, Peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG(H+L) 购自 Abmart 公司; Immobilon Western 化学发光 HRP 底物购自 Milipore 公司; PVDF 膜购自 Whatman 公司。

1.2 方法

1.2.1 CHO 细胞和 BL21 体系中 EPF 的表达与鉴定 重组细胞 CHO-pcDNA4.0-EPF 培养 144 h、重组表达菌株 BL21-pET28b-EPF 诱导培养 5 h 后, 分别收集真核 CHO 细胞上清、原核 BL21 菌体超声破碎后上清, 0.45 μm 滤膜初滤, 经 His-Ni 琼脂糖填料柱洗脱纯化目的蛋白。15% SDS-PAGE 分离, 蛋白上样量为 5 μg, 浓缩胶中电压为 80 V, 时间为 30 min, 分离胶中电压为 100 V, 时间为 80 min。60 mA 90 min 将蛋白质用半干转膜仪转移至 PVDF 膜上。50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 1:5000 稀释的鼠抗 His-tag 抗体, 4℃ 孵育过夜; 洗涤后, 加 HRP 标记的山羊抗鼠二抗 (1:5000), 室温孵育 1 h; 洗涤后, 取 ECL 荧光底物 A 液和 B 液各 1 mL, 混匀后均匀孵于膜上, 用 ChemiDoc-It 510 Imager 化学发光扫描仪成像。

1.2.2 EPF 特异性抗体的制备 本实验室前期制备了 BL21-EPF 单克隆抗体 A3, 故本部分不制备 BL21-EPF 抗体, 仅制备 nEPF 的多抗血清和 CHO-EPF 的多抗血清。将纯化得到的 nEPF 和 CHO-EPF 分别与弗氏完全佐剂 (首免) 做乳化处理, 以 50 μg/只的量各免疫 4 只小鼠, 采取脚垫、皮下联合多点注射的方法进行免疫。首免间隔 6 周后进行第 2 次免疫, 以后每隔 2 周免疫 1 次 (均用弗氏不完全佐剂), 每次免疫每只鼠使用 20 μg 抗原, 总共免疫 5 次。于第三次免疫起, 每次免疫一周后从下颌静脉采血获取小鼠多抗血清, BCA 试剂盒测得抗体浓度, 用间接 ELISA 法测定其效价。

1.2.3 免疫交叉反应测试 收集 nEPF、CHO-EPF、BL21-EPF、nEPF 多抗血清、CHO-EPF 多抗血清及 BL21-EPF 单克隆抗体 A3 纯化物, 用 BCA 法进行蛋白质定量。用 Western blotting、

ELISA 测定抗血清的效价并进行交叉反应试验。比较不同抗体组之间的交叉反应。① Western blotting: nEPF、CHO-EPF、BL21-EPF 各上样 5 μg, 对照蛋白胶银染, 其余四块转膜后分别孵育四种抗体 (nEPF 多抗血清、CHO-EPF 多抗血清及 BL21-EPF 单克隆抗体 A3 及阴性鼠血清), 抗体稀释度为 1:5000, 电泳、转膜及 Western blotting 操作同 1.2.1。② ELISA: nEPF、CHO-EPF、BL21-EPF 分别包被一 96 孔酶标板 (0.5 μg/孔), 用 nEPF 多抗、BL21-EPF 抗体、CHO-EPF 多抗作为一抗与每种来源的 EPF 分别反应。每个抗体稀释度做三个复孔。

1.3 统计学分析

运用 SPSS13.0 软件对以上结果进行统计分析, 求复孔 OD450 的均值、不同来源 EPF 抗体的 IC₅₀ 等。

$P/N = (\text{实验组 OD450} - \text{空白对照 OD450}) / (\text{阴性对照 OD450} - \text{空白对照 OD450})$

$P/N \geq 2.1$ 时, 定为阳性。

抗体有效率 % (IC₅₀) = $\Delta (\text{ODx} - \text{ODnegative control}) / \Delta (\text{ODpositive control} - \text{ODnegative control}) \times 100\%$

注: ODpositive control-- 抗原与其对应的特异性抗体反应时的吸光值。

ODx--EPF 多抗血清与各来源 EPF 抗原反应孔的吸光值;

ODmin-- 无任何处理的阴性鼠血清对照孔的吸光值。

本实验中 IC₅₀ 是指抗原包被浓度为 0.5 μg/孔, OD450=0.5, 抗原抗体反应所需的抗体浓度。同等抗原包被浓度下, IC₅₀ 值越小, 表明该抗体识别此类抗原的能力愈佳, 检测越灵敏。"- 指不反应。

2 结果

2.1 重组 EPF 的制备及鉴定

CHO 细胞和 BL21 均能表达 EPF, Mr 大小约为在 12 ku, 均与鼠抗 His-tag 抗体发生显色反应, 与预期一致。纯化得到 EPF 重组蛋白 -20℃ 保存待用。BL21-EPF 在 -20℃ 储存一段时间, 会发生聚合, 生成 25 ku 自聚物。

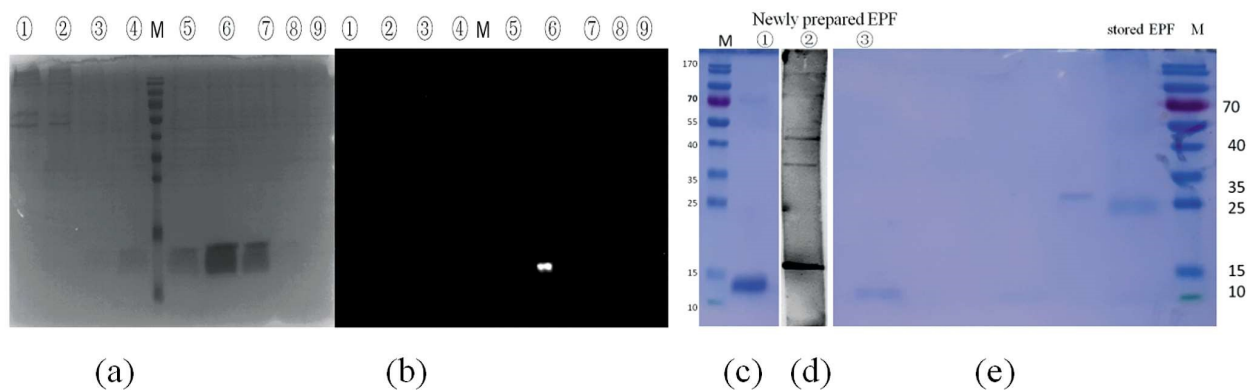
2.2 小鼠多抗血清效价测定结果

测定免疫小鼠血清效价, 阴性对照为未免疫的 BALB/c 小鼠血清, 其 OD450 如下表。结果判定: 本部分制备的 nEPF 多抗和 CHO-EPF 多抗在 ELISA 试验中均有强显色。其中 nEPF 组四只鼠的多抗血清混合物效价达到 1:100000 以上; CHO-EPF 组四只鼠的多抗血清混合物效价均达到 1:10000 以上。

2.3 三种来源的 EPF 的免疫交叉反应

Western blotting 检测三种来源的 EPF 的免疫交叉反应。结果显示: 图(a)为对照电泳胶银染: nEPF 在 26 ku 处深染 (lane ①), BL21-EPF 在 10 ku 处深染 (lane ②), CHO-EPF 在 10 ku 处深染 (lane ③); 图(b)为 nEPF 多抗孵育: nEPF 在 26 ku、52 ku 处有深染, BL21-EPF 在 10 ku 处有深染, CHO-EPF 无显色; 图(c)为 BL21-EPF 单抗 A3: nEPF 在 26 ku 处深染, BL21-EPF 在 10 ku 处深染, CHO-EPF 无显色; 图 (d) 为 CHO-EPF 多抗血清: nEPF 在 10 ku、26 ku 深染, BL21-EPF 在 10 ku 深染, CHO-EPF 在 10 ku 处深染。

对图 2 中(d)进行重复验证, 检测 CHO-EPF 多抗与三种来源的 EPF 的免疫交叉反应。结果如下: 图(a)CHO-EPF 多抗与



(a)The SDS-PAGE analysis of the CHO-pcDNA4.0-EPF expressing products;(b)The Western blotting of the CHO-pcDNA4.0-EPF expressing products;
(c)The SDS-PAGE analysis of the BL21-pET28b-EPF expressing products;(d)The Western blotting of the BL21-pET28b-EPF expressing products;(e)
The SDS-PAGE analysis of the stored BL21-pET28b-EPF expressing products.

图 1 CHO-pcDNA4.0-EPF、BL21-pET28 b-EPF 表达产物纯化后电泳及 Western blotting 图

Fig.1 The SDS-PAGE analysis and Western blotting of the products expressed in CHO-pcDNA4.0-EPF system and BL21-pET28 b-EPF system

表 1 nEPF 免疫组、CHO-EPF 免疫组小鼠血清效价(OD450)的测定

Table 1 The serum titers of nEPF, CHO-EPF immunized groups(OD450)

The serum titers	nEPF immunized group	CHO-EPF immunized group
1:100	1.826	1.448
1:1000	1.691	0.66
1:10000	1.243	0.18
1:100000	1.053	0.087
1:100(Negative)	0.085	0.056

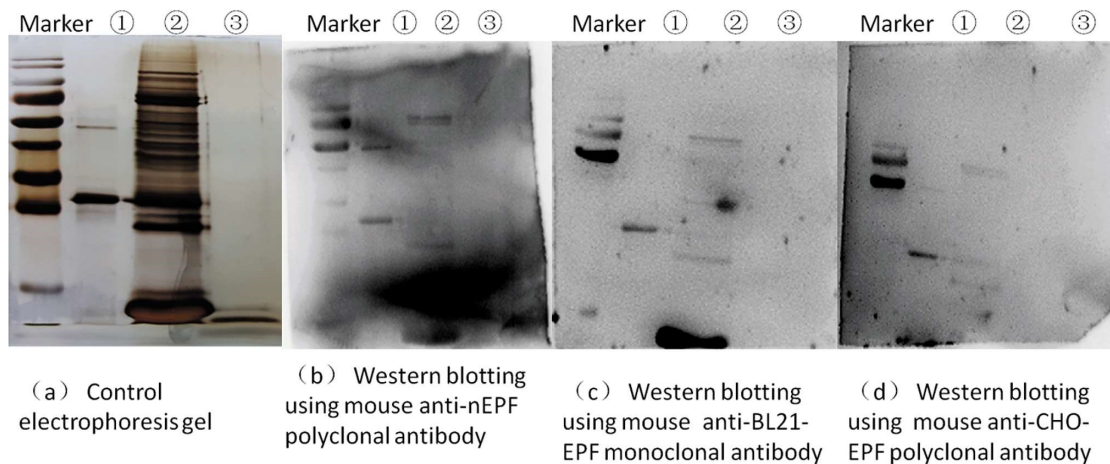


图 2 nEPF、BL21-EPF、CHO-EPF 的免疫交叉反应

Fig. 2 The cross reaction of nEPF, BL21-EPF, CHO-EPF by Western blotting

nEPF 在 10 ku、26 ku 处深染；图 (b)CHO-EPF 多抗与 BL21-EPF、CHO-EPF 在 10 ku 处深染；图(c)CHO-EPF 多抗与 CHO-EPF 和 BL21-EPF 在 10 ku 深染，与 nEPF 在 10 ku、26 ku 深染。

2.4 交叉反应之 ELISA 及 IC_{50} 计算

抗原包被量为 0.5 μ g/ 孔，倍比稀释抗体工作液，将三种来源的 EPF 及其抗体进行 ELISA 交叉反应。ELISA 结果显示：除 nEPF 多抗、BL21-EPF 多抗不能识别 CHO-EPF 外，不同来源的 EPF 抗原抗体相互之间能发生反应。且比较自身免疫原和其他

来源的 EPF，各抗体效价差异不大。

采用吸光值(OD450)和 IC_{50} 来对比不同来源的 EPF 免疫交叉反应的差异：OD450 越大， IC_{50} 值越小，说明抗原抗体结合反应越强烈；而 Western blotting 分析抗体识别蛋白质线性结构的差异。原核表达 BL21-EPF 与 nEPF 诱导的抗体能相互识别：BL21-EPF 单抗能识别 nEPF 中 26 ku 和 52 ku 组分；nEPF 多抗也能与 BL21-EPF 中 10 ku 组分反应；真核表达 CHO-EPF 与 nEPF 诱导的抗体不能相互识别：CHO-EPF 多抗能识别 nEPF 中 10 ku 和 26 ku 组分；但 nEPF 多抗不能与 CHO-EPF 反应；

原核表达 BL21-EPF 与真核表达 CHO-EPF 诱导的抗体不能相互识别;CHO-EPF 多抗能识别 BL21-EPF 中 10 ku 片段;但 BL21-EPF 单抗不能与 CHO-EPF 反应。

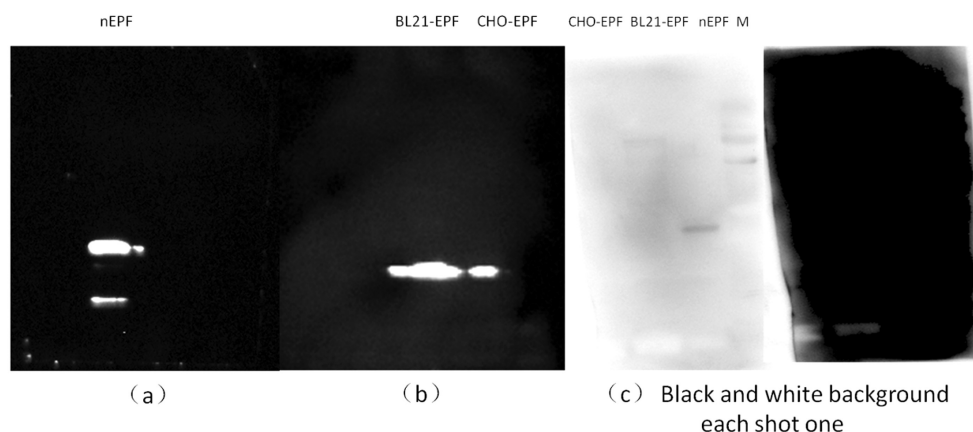


图 3 CHO-EPF 多抗与三种来源早孕因子 Western blotting

Fig.3 Western blotting using mouse anti-CHO-EPF polyclonal antibody with three kinds of EPF

表 2 nEPF、BL21-EPF、CHO-EPF 与 nEPF 抗体、BL21-EPF 抗体、CHO-EPF 抗体的交叉反应(OD450)

Table 2 The cross reaction of nEPF, BL21-EPF, CHO-EPF with nEPF antibody, BL21-EPF antibody, CHO-EPF antibody(OD450)

Coated antigen		nEPF		BL21-EPF			CHO-EPF		
Antibody dilution	nEPF PcAb	BL21-EPF McAb	CHO-EPF PcAb	nEPF PcAb	BL21-EPF McAb	CHO-EPF PcAb	nEPF PcAb *	BL21-EPF McAb *	CHO-EPF PcAb
1:100	2.264	0.38	0.584	0.403	0.173	0.324	0.049	0.055	0.693
1:1000	1.872	0.1	0.371	0.336	0.175	0.212	0.046	0.048	0.255
1:10000	0.765	0.068	0.129	0.327	0.173	0.146	0.046	0.046	0.109
1:100000	0.125	0.07	0.063	0.191	0.188	0.128	0.046	0.049	0.054
1:100(negative control)	0.056	0.051	0.055	0.061	0.057	0.058	0.048	0.055	0.046

Note: The above table "*" value exception, OD450 lower.

表 3 三种来源的 EPF 免疫交叉反应强度(IC50)

Table 3 The cross reaction of nEPF, BL21-EPF, CHO-EPF with nEPF antibody, BL21-EPF antibody, CHO-EPF antibody (IC50)

IC ₅₀ (ng/μL)	nEPF	BL21-EPF	CHO-EPF
① nEPF PcAb	3.105	4.762	-
② BL21-EPF McAb	431.061	9.317	-
③ CHO-EPF PcAb	70.589	84.307	37.66

3 讨论

抗原抗体反应是一个非常精准的识别过程。即便是表达同一基因片段,不同体系、不同种属对 EPF 蛋白的修饰加工方式不尽相同,从而影响 EPF 的免疫交叉反应。三种来源的 EPF 及其抗体组成的交叉反应方阵,可以评估不同来源的 EPF 的免疫交叉反应差异。本实验结果显示 CHO-EPF 与 nEPF 免疫交叉反应存在一定差异:nEPF 多抗不能与 CHO-EPF 反应,而 CHO-EPF 多抗能与 nEPF 反应。针对这一结果的重复实验已排除实验操作层面的假阴性假阳性可能。且在构建 CHO-pcDNA4.0-EPF 体系,目的蛋白设置了 His 标签,纯化产物组分单一,且经 Western blotting 验证是带有 His 标签、分子量为 10 ku 蛋白,故可排除 CHO-EPF 表达方面的失误。BL21-EPF 为原核体系表达、缺乏翻译后修饰、线性状态的蛋白,理论上包含

nEPF 所有的保守抗原表位。交叉反应测试提示 nEPF 抗体可以识别 BL21-EPF,表明本实验室提取的 nEPF 是真正的 EPF, nEPF 与 BL21-EPF 构象基本一致,CHO-EPF 与 nEPF 间免疫交叉反应差异是因翻译后修饰加工方式不同所致。

EPF 的鉴定常运用 RIT^[1]、移植动物模型^[9]等方法进行蛋白结构和免疫抑制特性的检测,结论往往是 rEPF 与 nEPF 的生物学活性基本一致^[2]。但因 RIT 和移植动物模型实验技术难度大,且结果判断主观性强,结论十分不可信。因此,在我们将 rEPF 应用于抗体制备时,仍质疑 rEPF 与 nEPF 具有一致的抗原表位,即是否存在免疫交叉反应。本研究构建原核、真核两大表达体系,结合 nEPF,运用体液免疫、SDS-PAGE、Western blotting、ELISA 等方法进行交互反应,排除干扰,展示了不同来源 EPF 的免疫交叉反应差异:rEPF 诱导的抗体均能有效识别 nEPF。这表明通过重组表达的方式制备 EPF 免疫原是可行的。

rEPF 的表达较传统提取工艺有明显优势。但因原核系统 BL21 表达的 EPF 缺乏 N 端修饰导致 rEPF 与血清载体蛋白结合受阻,致使 rEPF 半衰期只有 3.2 小时,相比 nEPF 6.2 天大幅降低^[9]。nEPF 存在较多二级结构:4 个 α 螺旋,7 个 β 折叠,2 个糖基化位点^[3]。蛋白构象与翻译后修饰加工可优化免疫系统对抗原表位的识别能力,进而使表达的蛋白更接近生物标本中 nEPF 天然构象。考虑到以上三个因素,研究者更倾向于用真核表达系统表达 EPF^[24]。本研究中,BL21-EPF 与 CHO-EPF 同为重组表达的 10 ku 蛋白,交叉反应测试显示:CHO-EPF 抗体能识别 BL21-EPF 和 nEPF,BL21-EPF 抗体能识别 nEPF,但不能识别 CHO-EPF。综合 CHO-EPF 不能被 BL21-EPF 抗体和 nEPF 抗体识别,且真核表达体系具有多种翻译后修饰能力^[25],可以推测真核体系表达 CHO-EPF 不仅有与 BL21-EPF 和 nEPF 相同的抗原表位,还有它们不具有的更精细的表位,因此诱导的抗体存在差异。

综上,本研究从体液免疫角度充分讨论了 rEPF 与 nEPF 免疫交叉反应的差异,因 rEPF 均能识别 nEPF,证明 rEPF 可替代 nEPF 用于抗体制备。CHO 表达体系表达的 EPF 具有更精细的高级结构,BL21 表达体系具有明显的成本优势。本实验室成功构建的 BL21-pET28 b-EPF 和 CHO-pcDNA4.0-EPF 体系可用于 rEPF 及检测抗体的制备。

参考文献(References)

- [1] Morton H, Hegh V, Clunie G J A. Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test [J]. *Nature*, 1974, 249(5456): 459-460
- [2] Somdevillatorres M J, Morton H, Zhang B, et al. Purification and characterisation of functional early pregnancy factor expressed in Sf9 insect cells and in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 32(2): 276-287
- [3] 宋立峰,刘静静,刘月琴,等.早孕因子蛋白基因的克隆及生物信息学分析[J].*中国草食动物科学*, 2014, (S1): 190-193
Song Li-feng, Liu Jing-jing, Liu Yue-qin, et al. Cloning and Bioinformatics Analysis of Early Pregnancy Factor Protein Gene[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2014 (S1): 190-193
- [4] 张冬云,王家骥,林丽白,等."人流血"中早孕因子的分离、纯化及鉴定[J].*中国生物制品学杂志*, 2000, 13(3): 151-153
Zhang Dong-yun, Wang Jia-ji, Lin Li-bai, et al. Isolation, Purification and Identification of Early Pregnancy Factors from Human Blood Collected During Artificial Abortion [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2000, 13(3): 151-153
- [5] 刘晓宇. 孕妇血清中早孕因子的分离纯化及其单抗阶段性初步制备的研究[D]. 新疆医科大学, 2005
Liu Xiao-yu. Purification of Early Pregnancy Factor Human Pregnancy Sera and Preliminary Study on Preparation of Monoclonal Antibody to EPF[D]. Xinjiang Medical University, 2005
- [6] 袁武梅. 孕妇血清中早孕因子的分离纯化及鉴定 [D]. 新疆医科大学, 2006
Yuan Wu-mei. Purification and Characterization of Early Pregnancy Factor from Human Pregnant sera [D]. Xin jiang Medical University, 2006
- [7] 温志锋,练玉银,王家骥,等.早孕因子分离纯化方法的优化[J].*免疫学杂志*, 2012, (12): 1073-1076
Wen Zhi-feng, Lian Yu-yin, Wang Jia-ji, et al. Optimization of A Method for Isolation and Purification of Early Pregnancy Factor [J]. *Journal of Immunology*, 2012, (12): 1073-1076
- [8] 左祥生,苏宝田. 孕血清中早孕因子生化特性的研究[J].*安徽医科大学学报*, 1991, (02): 85-87
Zuo Xiang-sheng, Su Bao-tian. The Study on Biochemistry Property of Early Pregnancy Factor in pregnant sera [J]. *Journal of Anhui Medical University*, 1991, (02): 85-87
- [9] F M Clarke H M G J. Detection and separation of two serum factors responsible for depression of lymphocyte activity in pregnancy [J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 1978, 32(2): 318
- [10] Morton H, Morton D J, Ellendorff F. The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig [J]. *Reproduction*, 1983, 69(2): 437-446
- [11] Yoshioka K, S Iwamura, H Kamomae. Application of anti-bovine CD2 monoclonal antibody to the rosette inhibition test for detection of early pregnancy factor in cattle [J]. *Vet Med Sci*, 1995, 57(4): 721-725
- [12] Clarke F M, Morton H, Rolfe B E, et al. Partial characterisation of early pregnancy factor in the sheep [J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 1980, 2(3): 151-162
- [13] Cavanagh A C, Morton H. The purification of early pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10[J]. *FEBS Journal*, 1994, 222(2): 551-560
- [14] Rolfe B E, Morton H, Cavanagh A C, et al. Detection of an Early Pregnancy Factor-Like Substance in Sera of Patients With Testicular Germ Cell Tumors [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1983, 3(2): 97-100
- [15] 张冬云,王家骥,杨英,等.肿瘤源性早孕因子的筛选、纯化及鉴定[J].*中国生化药物杂志*, 2002, 23(1): 3-6
Zhang Dong-yun, Wang Jia-yi, Yang Ying, et al. Screening, purification and identification of tumor-derived early pregnancy factors [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2002, 23 (1): 3-6
- [16] 王敏华,苏宝田. 恶性滋养叶细胞肿瘤患者血清中早孕因子样物质的初步提纯[J].*安徽医科大学学报*, 1992, (2): 98-101
Wang Min-hua, Su Bao-tian. Isolation and Purification of EPF-Like Substance in the serum of Patients with Malignant Trophoblastic Tumor[J]. *Journal of Anhui Medical University*, 1992, (2): 98-101
- [17] Cavanagh A C. Production in vitro of mouse early pregnancy factor and purification to homogeneity [J]. *Reproduction*, 1984, 71 (2): 581-592
- [18] Cavanagh A C. Identification of early pregnancy factor as chaperonin 10: implications for understanding its role [J]. *Reviews of Reproduction*, 1996, 1(1): 28-32
- [19] Morton H, McKay D A, Murphy R M, et al. Production of a recombinant form of early pregnancy factor that can prolong allogeneic skin graft survival time in rats [J]. *Immunology and Cell Biology*, 2000, 78(6): 603-607
- [20] 练玉银,王家骥. 重组早孕因子(EPF)的表达、纯化及鉴定[J].*生殖与避孕*, 2012, 32(3): 156-160

- [21] Jensen KB, Forcada Y, Church DB, et al. Evaluation and diagnostic potential of serum ghrelin in feline hypersomatotropism and diabetes mellitus[J]. *J Vet Intern Med*, 2015, 29(1): 14-20
- [22] Zhang L1, Pi J, Shi Q, et al. In situ single molecule detection of insulin receptors on erythrocytes from a type 1 diabetes ketoacidosis patient by atomic force microscopy [J]. *Analyst*, 2015, 140 (21): 7407-7416
- [23] Sakurazawa N1, Mano-Otagiri A, Nemoto T, et al. Effects of intracerebroventricular ghrelin on food intake and Fos expression in the arcuate nucleus of the hypothalamus in female rats vary with estrous cycle phase[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 29(541): 204-208
- [24] Siegl D, Midura EF, Annecke T, et al. The effect of ghrelin upon the early immune response in lean and obese mice during sepsis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122211
- [25] Hsu TM, Hahn JD, Konanur VR, et al. Hippocampus ghrelin signaling mediates appetite through lateral hypothalamic orexin pathways[J]. *Elife*, 2015, 4. pii: e11190
- [26] McCallum RW, Lembo A, Esfandiyari T, et al. Phase 2b, randomized, double-blind 12-week studies of TZP-102, a ghrelin receptor agonist for diabetic gastroparesis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25(11): e705-717
- [27] Beck DE, Sweeney WB, McCarter MD. Prospective, randomized, controlled, proof-of-concept study of the Ghrelin mimetic ipamorelin for the management of postoperative ileus in bowel resection patients [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2014, 29(12): 1527-1534
- [28] Peleli M, Carlstrom M. Adenosine signaling in diabetes mellitus and associated cardiovascular and renal complications [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 12
- [29] Devaraj S, Venkatachalam A, Chen X. Metformin and the Gut Microbiome in Diabetes[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(12): 1554-1555
- [30] Barbaresi P, Mensà E, Lariccia V, et al. Intracallosal neuronal nitric oxide synthase neurons colocalize with neurokinin 1 substance P receptor in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(4): 589-607
- [31] Nascimento RD, Martins PR, de Souza Lisboa A, et al. An imbalance between substance P and vasoactive intestinal polypeptide might contribute to the immunopathology of megaesophagus after *Trypanosoma cruzi* infection[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(2): 269-276
- [32] Bódi N, Talapka P, Poles MZ, et al. Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus [J]. *Microcirculation*, 2012, 19(4): 316-326
- [33] D Garella R, Baccari MC. Endocannabinoids modulate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in strips from the mouse gastric fundus[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 206(1): 80-87
- [34] Mani V, Ramasamy K, Ahmad A, et al. Effects of the total alkaloidal extract of *Murraya koenigii* leaf on oxidative stress and cholinergic transmission in aged mice[J]. *Phytother Res*, 2013, 27(1): 46-53
- [35] Alrefaie Z, Alhayani A. Vitamin D. improves decline in cognitive function and cholinergic transmission in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 287 (1): 156-162
- [36] Yoon H, Thakur V, Isham D, et al. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats[J]. *Exp Neurol*, 2015, 267(2): 107-114
- [37] Hansen CF, Vrang N, Sangild PT, et al. Novel insight into the distribution of L-cells in the rat intestinal tract [J]. *Am J Transl Res*, 2013, 5(3): 347-358
- [38] Lopes CR1, Ferreira PE, Zanoni JN, et al. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(12): 3106-3115
- [39] Ma J1, Checklin HL, Wishart JM, et al. A randomised trial of enteric-coated nutrient pellets to stimulate gastrointestinal peptide release and lower glycaemia in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(6): 1236-1242
- [40] Andrew Vosko, Hester van Diepen, Dika Kuljis, et al. Role of vasoactive intestinal peptide in the light input to the circadian system [J]. *Eur J Neurosci*, 2015, 42(2): 1839-1848
- [41] Kristy M. Heppner, Carolin L. et al. Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors[J]. *Diabetes*, 2014, 63(1): 122-131

(上接第 620 页)

- Lian Yu-yin, Wang Jia-ji. Expression, Purification and Identification of Recombinant Early Pregnancy Factor (EPF) [J]. *Reproduction and Contraception*, 2012, 32(3): 156-160
- [21] Hill H Z, Halcrow M B. Expression of galactose genes in mammalian cells Galactose enzymes in Chinese hamster ovary cell hybrids[J]. *Biochem Genet*, 1972, 7(2): 117-126
- [22] Lueking A, Holz C, Gotthold C, et al. A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2000, 20(3): 372-378
- [23] 万晶宏, 贺福初. 蛋白质组技术的研究进展 [J]. *科学通报*, 1999, (09): 904-911
- Wan Jing-hong, He Fu-chu. Progress in Research of Proteomics technology[J]. *Science Bulletin*, 1999, (09): 904-911
- [24] 谢彦博. 蛋白质抗原的免疫原性和特异性的分子基础(综述)[J]. *国外医学. 生物制品分册*, 1979, (02): 7-11
- Xie Yan-bo. The Protein antigen's immunogenicity and specificity molecular basis (review)[J]. *Foreign Medicine Biologics Volume*, 1979, (02): 7-11
- [25] Yamamoto D, Ando T. Chaperonin GroEL-GroES Functions as both Alternating and Non-Alternating Engines [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428 (15): 3090-3101