

Ad-sTNFRI-IgGFc 腺病毒载体的构建及其转染人气道平滑肌细胞

苏瑾¹, 尤长宣¹, 蔡绍曦¹, 马骊², 王小宁², 温茜², 罗微², 黄泳塔²

1 南方医科大学南方医院呼吸科, 广州 510515

2 南方医科大学生物技术学院分子免疫研究所, 广州 510515

摘要: TNF- α 是一种具有广泛生物学活性的前炎症细胞因子, 参与哮喘整个病理生理过程。可溶性肿瘤坏死因子受体(sTNFR)可以拮抗肿瘤坏死因子活性, 已被用来治疗与 TNF 相关的炎症性疾病。将 sTNFRI-IgGFc 基因插入腺病毒穿梭质粒 pDC316, 与辅助质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre 共转染 HEK293 细胞, 重组产生 Ad-sTNFRI-IgGFc, PCR 鉴定毒种正确后, 进行扩增、纯化和滴度测定, 转染人气道平滑肌细胞, 利用 RT-PCR、免疫组化方法, 流式细胞仪, ELISA 检测转染后细胞中 sTNFRI-IgGFc 的转录和表达。实验结果证明成功构建了 Ad-sTNFRI-IgGFc 腺病毒载体, 感染性滴度达 3×10^{10} TCID₅₀/mL, 200 moi 转染气道平滑肌细胞阳性率达 99.32%, 转染后气道平滑肌细胞在 mRNA 和蛋白水平均有 sTNFRI-IgGFc 表达。转染上清稀释 64 倍后仍对 TNF 有拮抗活性。为将表达 sTNFRI-IgGFc 腺病毒基因治疗哮喘的实验研究提供了基础。

关键词: 可溶性肿瘤坏死因子受体, 腺病毒载体, 人气道平滑肌细胞, 支气管哮喘

Construction of Adenoviral Vector Encoding Soluble Human sTNFRI-IgGFc cDNA and Its Expression in Human Airway Smooth Muscle Cells (HASMCS)

Jin Su, Changxuan You, Shaoxi Cai, Li Ma, Xiaoning Wang, Qian Wen, Wei Luo, and Yongta Huang

1 Department of Respiratory Diseases, Nanfang hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

2 Institute of Molecular Immunology, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Tumour necrosis factor (TNF- α) is a pro-inflammatory cytokine that has been implicated in many aspects of the airway pathology in asthma, and which has recently been highlighted as potentially important in refractory asthma. To study the feasibility of local treatment of asthma with recombinant adenovirus vector carrying soluble extra-cellular region of TNF receptor I-IgGFc (sTNFRI-IgGFc) fusion protein, The sTNFRI-IgGFc gene was subcloned into the adenovirus shuttle plasmid pDC316, the products were co-transfected into HEK293 cell line with helper plasmid pBHGlox Δ E1,3Cre. The recombinant adenovirus (Ad-sTNFRI-IgGFc) was produced by homologous recombination of above 2 plasmids in HEK293 cells. After identification with PCR, Ad-sTNFRI-IgGFc was amplified and purified, its titer was measured by TCID₅₀ assay. The transcription and expression of sTNFRI-IgGFc gene in transfected human airway smooth muscle cells (HASMCS) was detected by RT-PCR, ELISA and immunological histochemistry.

Received: February 28, 2008; **Accepted:** April 10, 2008

Supported by: the Nation High Technology Research and Development Program of China ("863" Program) (No. 2007AA02Z458).

Corresponding author: Shaoxi Cai. Tel: +86-20-61641571; E-mail: hxkc@fimmu.com; Li Ma. Tel: +86-20-61648322; E-mail: maryhmz@126.com
国家高技术研究发展计划(863) (No. 2007AA02Z458)资助。

The anti-TNF activity assay of transfected HASMCs culture supernatant was measured by MTT. Ad-sTNFRI-IgGFc was successfully constructed with the titer of 3×10^{10} TCID₅₀/mL. Ad-sTNFRI-IgGFc can transfect HASMC with high efficacy. The transcription of sTNFRI-IgGFc mRNA and the expression of protein were confirmed in the transfected HASMCs. Moreover, the product in 100 μ L expression supernatant could completely antagonize the cytolytic effect of 2ng TNF α on L929 cells, even at 1/64 dilution. This study forms the basement of the experiment study on local treatment of asthma with adenovirus expressing sTNFRI-IgGFc.

Keywords: soluble tumor necrosis factor alpha receptor(sTNFR), adenovirus vector, human airway smooth muscle cells(HASMCs), asthma

TNF- α 是一种具有广泛生物学活性的前炎症细胞因子,参与哮喘整个病理生理过程。哮喘患者血清 TNF- α 水平明显高于缓解组及对照组,哮喘病情越严重,持续时间越长,其血清 TNF- α 浓度越高,反之病情越轻,持续时间越短浓度越低。提示在哮喘的早期控制 TNF- α 的释放可起到治疗作用^[1-3]。TNF 的生物学活性是通过细胞表面相应的受体来实现的, TNF- α 和 TNF- β 有两个相同的受体: P55 (TNFRI)和 P75 (TNFRII)受体,广泛分布于体内大多数细胞的表面。TNF 受体(TNFR) 的胞外区在特定情况下可以脱落下来,形成可溶性受体(sTNFR)。sTNFR 不再介导信号传递,但仍能与 TNF α 结合,从而阻断 TNF α 与 mTNFR 的结合,封闭 TNF 的生物学活性,因而可用于治疗与 TNF α 有关的疾病^[4]。

本实验利用新型 Admax 腺病毒载体系统,制备携带人 sTNFRI-IgGFc 融合基因的重组腺病毒,转染人气道平滑肌细胞(human airway smooth muscle cells HASMCs),并对转染后细胞中 sTNFRI-IgGFc 的表达及拮抗 TNF 活性进行检测,为进一步开展 sTNFRI-IgGFc 腺病毒基因转染治疗哮喘的体内动物实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 腺病毒载体,细胞株和菌株

AdmaxTM Kit D 重组腺病毒载体系统购自加拿大 Microbix 公司,主要包括穿梭质粒 pDC316、辅助质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre、包装细胞 HEK293;携带增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因的重组腺病毒 Ad-EGFP 购自北京本元正阳公司; pBluescrip/sTNFRI-IgGFc 质粒、大肠杆菌 DH5 α 菌株,小鼠成纤维细胞株 L929 细胞,由南方医科大学分子免疫研究所保存。

1.2 主要试剂

mRNA 提取试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,限制性内切酶、连接酶购自 New England Biolabs 公司; DMEM 培养液、胎牛血清(FCS)购自 Hyclone 公司。sTNF- α 标准品和 MTT 为 Sigma 公司产品。兔抗 TNFRI 抗体,即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。TNFRI ELISA 检测试剂盒购自美国 Rapid Bio Lab 公司。

1.3 目的基因的扩增及穿梭质粒的构建

引物由上海生工公司合成。上游引物: 5'-ATG AGCTCATGGGCCTCTCCACCGTGCCTG-3' 引入 *Sac* I 位点,下游引物: 5'-ATGTCGACTCATTACC CGGAGACAGGGAGAGG-3' 引入 *Sal* I 位点,以 pBluescrip/sTNFRI-IgGFc 为模板,PCR 扩增 sTNFRI-IgGFc 基因,扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物插入 pGEM-T 载体,转化感受态菌 DH5 α ,提取质粒, DNA 测序正确后,以 *Sac* I 及 *Sal* I 双酶切,回收 1332 bp 片段,插入穿梭载体 pDC316 的相同位点,以连接产物转化 DH5 α 感受态菌,提取质粒,酶切鉴定。

1.4 重组腺病毒的包装鉴定及扩增和纯化

将穿梭质粒 pDC316-sTNFRI-IgGFc、辅助质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre 与脂质体的混合物转染 293 细胞,出现单个噬斑后,小心吸取单个噬斑,再次感染 293 细胞。病变后取上清液 50 μ L,加入 2 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL), 55 $^{\circ}$ C 消化 1 h,煮沸 10 min,立即放入冰浴 5 min,取 1 μ L 作为模板进行 PCR 鉴定,扩增条件同上。293 细胞接种于 75 cm² 培养瓶,待长至 90%融合时,加入上述阳性单克隆病毒液 100 μ L,加入含 10% FCS 的 DMEM 培养液培养 40 h,出现细胞病变效应后,收集细胞,反复冻融 3 次,离心取上

清收获病毒。病毒液经 2 次氯化铯密度梯度离心, 透析去除氯化铯得到纯化病毒液, EP 管分装后 -70°C 冻存备用。

1.5 重组腺病毒的滴度测定

50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀)计算病毒滴度: 293 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 24 h 后将系列稀释的病毒液加入孔中, 每个稀释度接种 10 孔, 设置 2 孔为阴性对照, 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱培养 10 d, 观察每个稀释度细胞病变效应(CPE)出现的百分率, 按照 Admax 操作手册中的公式计算重组病毒的滴度

1.6 人气道平滑肌取材和细胞分离培养与鉴定

人的支气管组织取自本院肺叶切除病人, 要求患者无哮喘等过敏性疾病史, 肺癌患者的标本要在远离癌肿 5 cm 以外的位置切取。新鲜的肺组织标本在无菌的 D-Hanks 液(含青、链霉素各 105 u/L)内进行分离, 选取管径约 2~6 mm 的支气管, 去除周围的血管等连接组织, 剪开去除内膜, 得到平滑肌条, 剪成约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的小块, 置消化液(由 D-Hanks 液加 I 型胶原酶 1 g/L、木瓜蛋白酶 1 g/L、BSA 5 g/L 配制而成)内 36°C 消化 40 min。后加入 DMEM 培养液, 混匀后用金属滤网过滤, 滤液置离心管内离心(1000 r/min) 10 min。弃去上清后, 沉淀的细胞用含 10% 灭活 FCS 的 DMEM 培养液重悬, 接种到培养瓶内, 让细胞贴壁生长。0.25% 胰蛋白酶消化传代 3~7 代的细胞用于试验。细胞通过形态学观察并经 α 肌动蛋白(α -actin)免疫染色鉴定为平滑肌细胞。

1.7 重组腺病毒转染人气道平滑肌细胞

待传代细胞贴壁生长至 60%~70% 融合时, 吸去培养液, 用 PBS 洗 1 次, 加无血清 DMEM 培养液, 置 37°C 、5% CO_2 孵箱孵育 20 min, 按感染复数(MOI)=200 加入病毒液, 孵育 45 min 后, 补加完全 DMEM 培养液使体系中血清浓度为 5%, 孵育 4 h 后全量换为完全 DMEM 培养液, 48 h 后检测指标。

1.8 转染效率的检测

荧光显微镜下观察转染 Ad-GFP 的气道平滑肌细胞形态, 然后用 0.25% 胰蛋白酶/0.01% EDTA 消化细胞, PBS 洗涤三次后用 2% 甲醛-PBS 按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬, 流式细胞术检测表达 GFP 的阳性

细胞率。

1.9 转染后气道平滑肌细胞中 sTNFRI-IgGFc 表达检测

1.9.1 RT-PCR 检测 sTNFRI-IgGFc mRNA 表达

收集病毒转染后细胞, 按说明书步骤提取 mRNA, 并进行 RT-PCR 检测, PCR 引物和条件同 1.2.1。

1.9.2 免疫组化检测 sTNFRI-IgGFc 蛋白表达

胰酶消化气道平滑肌细胞, 以 1.5×10^5 /孔的浓度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 将 Ad-sTNFRI-IgGFc 病毒以 MOI=200 转染细胞, 48 h 后胰酶消化, 计数。以 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5/200 \mu\text{L}$ 的浓度滴加于经紫外照射消毒的硅化玻片上, 置于湿盒中, 在 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养过夜。第二天取出玻片, PBS 洗涤 2 min \times 3 次后, 置于 4% 多聚甲醛中固定 60 min, 双蒸水充分洗涤, 采用即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒, 以 1:100 稀释的兔抗 TNFRI 抗体为一抗, 之后按试剂盒说明书步骤进行。

1.9.3 TNFRI ELISA 检测试剂盒检测腺病毒转染的人平滑肌细胞上清中 sTNFRI-IgGFc 蛋白表达

按试剂盒说明, 采用双抗夹心 ELISA 法检测 TNFRI 的浓度。加入 100 μL 标准品, 100 μL 转染上清于相应反应板孔中, 37°C 温育 60 min, 洗板, 加入 100 μL 生物素化 anti TNFRI 抗体(anti-TNFRI Biotin), 37°C 温育 60 min, 洗板, 拍干, 加入 100 μL 浓缩酶联物(HRP)抗体, 37°C 温育 30 min, 洗板, 拍干, 加入 100 μL TMB 显色液, 暗处温育 15 min, 加入终止液, 450 nm 处读取 OD 值, 以 OD 值为纵坐标, 标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线。根据样品 OD 值查出其浓度。

1.10 表达 sTNFR-IgGFc 的气道平滑肌细胞上清对 TNF α 的拮抗活性

L929 细胞以 2×10^4 /孔接种到 96 孔细胞培养板中, 用含 10% 血清的 DMEM 培养基, 37°C 、5% CO_2 孵育 24 h。将转染 24 h 的细胞上清 100 μL 倍比稀释, 与 100 μL 含 2 ng TNF α 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素 C 的培养基混合, 37°C 孵育 2 h, 然后加到 L929 细胞上, 37°C 、5% CO_2 孵育 24 h。弃去上清, 加入 100 μL PBS 和 10 μL 5 mg/mL MTT, 37°C 、5% CO_2 孵育 4 h。弃上清, 加入 20 μL DMSO 裂解细胞, 570 nm 测吸光度 A 值。

2 结果

2.1 腺病毒穿梭质粒的构建

PCR 扩增的 sTNFR-IgGFc 基因片段的长度为 1332 bp, 与预计的大小相符, 将其插入 pGEM-T 载体, 转化宿主菌 DH5 α , 提取质粒, DNA 序列分析证实与国外文献的报道相一致。腺病毒穿梭质粒 pDC316/sTNFR-IgGFc 经 *Sac* I+*Sal* I 双酶切, 得到相应的片段, 即 1332 bp 目的基因的和 3913 bp 的载体(图 1)。

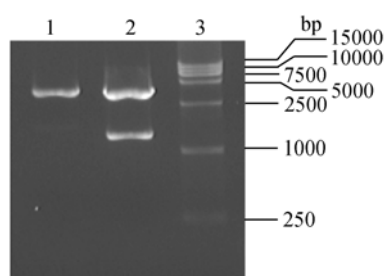


图 1 穿梭质粒 pDC316/sTNFR-IgGFc 的酶切鉴定
Fig. 1 Identification of shuttle plasmid pDC316/sTNFR-IgGFc with restriction enzyme digestion
1: pDC316/sTNFR-IgGFc digested by *Sac* I; 2: pDC316/sTNFR-IgGFc digested by *Sal* I; 3: DL15000 marker

2.2 重组腺病毒的制备和鉴定

pDC316-sTNFR-IgGFc 和 pBHGlox Δ E1, 3Cre 共转染 HEK293 细胞后 8 d 逐渐出现肿胀、变圆、呈葡萄串样、部分漂浮等细胞病变效应的表现。取产毒 293 细胞上清做 PCR 检测, 扩增出 1332 bp 大小的特异性条带, 与预期大小相符, 证实重组腺病毒携带 sTNFR-IgGFc 基因(图 2), 在 293 细胞中扩增、纯化后, 测定 Ad-sTNFR-IgGFc 的感染性滴度为 3×10^{10} TCID₅₀/mL。

2.3 Ad-GFP 对气道平滑肌的转染效率

气道平滑肌细胞呈长梭形, 呈现“峰和谷”生长状态; 以 MOI=200 将 Ad-GFP 转染人气道平滑肌 48 h 后, 细胞形态未见明显改变, 荧光显微镜下观察有 GFP 表达的细胞达 95% 以上, 流式细胞术检测表达 GFP 的细胞阳性率可达 99.32%。

2.4 Ad-sTNFR-IgGFc 转染后气道平滑肌中外源基因的表达检测

2.4.1 RT-PCR 检测 sTNFR-IgGFc mRNA 表达

提取转染后 48 h 的气道平滑肌细胞的总 RNA, RT-PCR 检测到约 1332 bp 大小的特异性条带, 表明 sTNFR-IgGFc 基因在 mRNA 水平表达, 而空白细胞

未检测到相应大小的条带(图 5)。

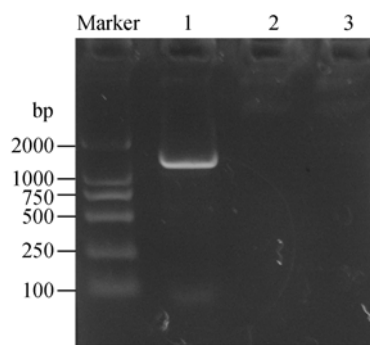


图 2 重组腺病毒 Ad-sTNFR-IgGFc 的 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant Ad-sTNFR-IgGFc with PCR

1: PCR using culture supernatant of recombinant Ad-sTNFR-IgGFc transfected HEK293 cells as template; 2,3: PCR using culture supernatant of non-transfected HEK293 cells as template

2.4.2 免疫组化检测 sTNFR-IgGFc 蛋白表达

细胞爬片的免疫组化染色显示, 转染后的气道平滑肌细胞的胞浆中充满棕黄色颗粒, 而未转染细胞为阴性, 证实转染后的气道平滑肌细胞中 Ad-sTNFR-IgGFc 蛋白高表达(图 6)。

2.4.3 ELISA 检测 sTNFR-IgGFc 蛋白分泌

结果显示, Ad-sTNFR-IgGFc 转染后 HASMCs 表达的 TNFR 蛋白分泌到培养上清中, 表达高峰在转染后 48 h, 表达量为 11.3 ng/mL, 表达持续至少 1 周以上。

2.5 表达 sTNFR-IgGFc 的气道平滑肌细胞上清对 TNF α 的拮抗活性抗

L929 细胞对 TNF- α 的细胞毒活性敏感, 因此本研究用转染细胞培养上清中和 TNF- α , 然后用 L929 细胞测定残存的 TNF- α 的细胞毒活性, 以评价转染的气道平滑肌细胞上清对 TNF- α 的拮抗活性。如图 8 所示, 100 μ L 转染细胞的上清能够完全中和 2 ng TNF- α 对 L929 的细胞毒活性。在稀释 64 倍后, 转染细胞上清仍对 TNF- α 有一定的中和活性。未转染的 HASMCs 细胞培养上清对 TNF- α 没有中和活性。表明这种中和是由于表达的 sTNFR-IgGFc 与 TNF- α 特异的结合而导致的。

3 讨论

TNF- α 是哮喘过程中一重要的启动因子, 哮喘时各种过敏原使呼吸道上皮细胞、血管内皮细胞及

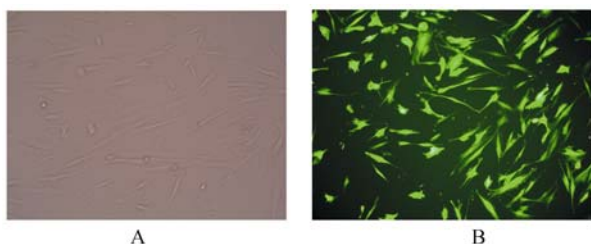


图3 Ad-GFP 转染 HASMCS 的形态学观察($\times 400$)

Fig. 3 Morphology of Ad-GFP transfected HASMCS ($\times 400$)

A: HASMCS before transfection; B: HASMCS transfected by Ad-GFP at m.o.i. of 200

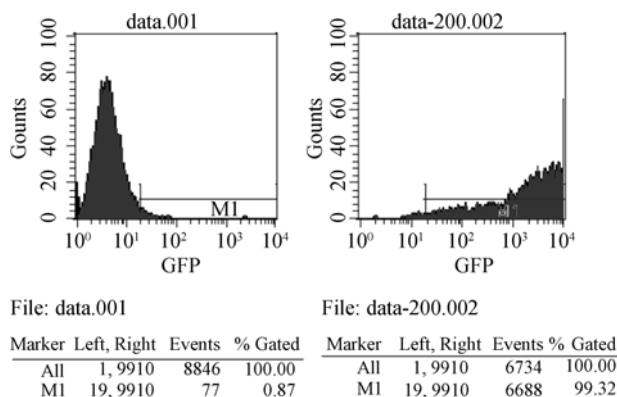


图4 流式细胞术检测 Ad-GFP 转染气道平滑肌细胞的转染效率

Fig. 4 Transfection efficiency of HASMCS by Ad-GFP detected with FACS

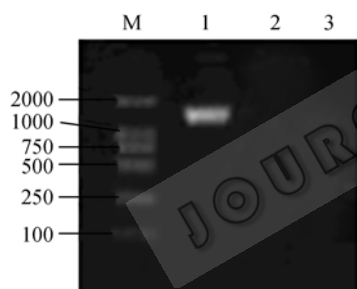


图5 转染后 HASMCS 中 sTNFRI-IgGFc mRNA 表达的 RT-PCR 分析

Fig. 5 RT-PCR detection of sTNFRI-IgGFc mRNA expression in transfected HASMCS

M: DL2000 marker; 1: Ad-sTNFRI-IgGFc transfected HASMCS; 2,3: non-transfected HASMCS

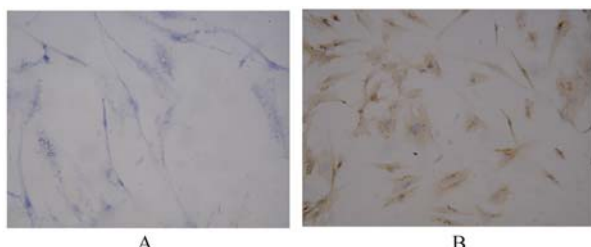


图6 转染后气道平滑肌细胞中 sTNFRI-IgGFc 蛋白表达的免疫组化分析(DAB 显色 $\times 400$)

Fig. 6 Immunological histochemistry assay of sTNFRI-IgGFc protein expression in transfected HASMCS

A: non-transfected HASMCS; B: Ad-sTNFRI-IgGFc transfected HASMCS

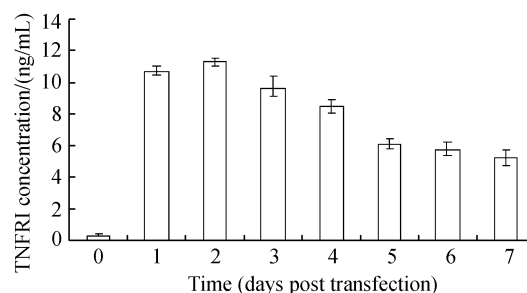


图7 ELISA 检测 sTNFRI-IgGFc 在 HASMCS 中的表达

Fig. 7 ELISA analysis of the expression of TNFRI-IgGFc

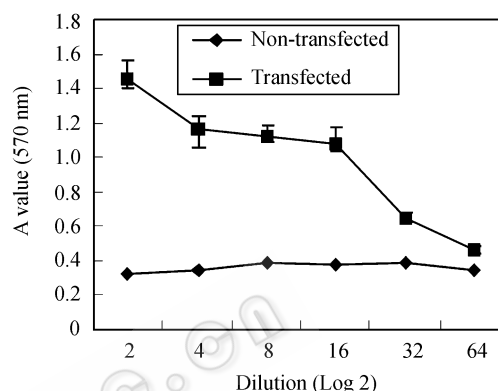


图8 HASMCS 细胞培养上清拮抗 TNF 活性检测

Fig. 8 The anti-TNF activity assay of transfected HASMCS culture supernatant

肺外周血白细胞活化, 释放 TNF, 它通过增加细胞间黏附分子、血管细胞黏附分子表达, 诱导血小板活化因子及白细胞介素 1、6、8 的释放, 刺激前列腺素、白三烯和嗜酸性细胞阳离子蛋白等过敏毒素的合成, 导致哮喘时气道高反应性的发生。已有多个临床实验证实以 TNF 抑制剂为代表的生物制剂可有效改善重症复发性哮喘, 成为近年来研究哮喘治疗的一个热点^[3, 5-7], 目前共有 3 种 TNF 抑制剂获美国 FDA 批准上市: Etanercept 为可溶性受体拮抗剂, Infliximab 和 Adalimumab 为 TNF- α 特异性单抗。但在取得疗效的同时, 全身用药也带来了一些不良反应, 如注射部位反应、感染、肿瘤发病率增加等^[9, 10], 而局部用药可以避免这些副作用。

可溶性 TNFR(sTNFR)通过竞争阻断 TNF- α 与膜受体结合, 特异性抑制其介导的炎症反应和血管新生。借助基因工程手段, 将两个 TNFR 胞外区与人 IgGFc 的 CH2, CH3 及铰链区偶联, 构建类似“Y”形的融合蛋白(sTNFR-IgGFc), 可有效延长受体在体内的半衰期, 并且这种双价的、抗体类似的

分子具有比 sTNFR 单体更强的抗炎活性^[11,12]。美国 Immunex 公司研制的 sTNFRII-IgGFc(Etanercept)已用于临床治疗类风湿性关节炎(RA),而 sTNFRI-IgGFc 在 RA 治疗上表现不佳,原因是长期大剂量注射给药导致患者体内产生抗体,使其在体内被快速清除^[13]。但 sTNFRI 与 TNF- α 的亲合力显著高于 sTNFRII^[14],中和 TNF- α 的效果比 sTNFRII 强。而且 TNF- α 与 sTNFRI 的亲合力高于其与抗体的亲合力,Engelmann 等^[15]报道 sTNFRI 与 TNF- α 的亲合常数 K_a 值在 $10^9 \sim 10^{10}$ 之间,而 TNF- α 抗体与 TNF- α 的 K_a 值只有 $10^5 \sim 10^6$ 。因此,对于局部用药治疗来讲, TNFRI 较 TNF- α 抗体和 TNFRII 更有优势。

重组 sTNFRI-IgGFc 价格昂贵,在体内易被代谢,需反复给药以维持局部持续有效的作用浓度。新型 AdMax 系统通过重组酶在真核细胞内完成重组出毒,高效且稳定,是目前最简便快捷的腺病毒载体系统,也是将 sTNFRI-IgGFc 基因转入气道平滑肌细胞的理想载体,实验证实 Ad-sTNFRI-IgGFc 可以高效转染人气道平滑肌细胞,感染效率达 99%,表达产物可以持续一周以上,因此可应用于哮喘的基因治疗。在本实验研究中,我们以 sTNFRI-IgGFc 为目的基因、以气道平滑肌细胞为靶细胞,借助 AdMax 腺病毒载体系统,将 sTNFRI-IgGFc 基因转入气道平滑肌细胞并实现了其高效表达,转染病毒后细胞上清对 TNF α 有较强的拮抗活性,为其基因转染治疗哮喘的动物实验研究提供了基础。

REFERENCES

- [1] Berry MA, Hargadon B, Shelley M, *et al.* Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med*, 2006, **354**(7): 697-708.
- [2] Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000, **106**(6), 1033-1042.
- [3] Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, *et al.* Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*, 2005, **60**(12): 1012-1018.
- [4] He J, Yao LH, Chen AJ, *et al.* Expression of sTNFR-IgGFc fusion gene in endothelial cell and its application in gene therapy for rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(3): 378-383.
何捷, 姚立红, 陈爱军, 等. sTNFR-IgGFc 融合基因在内皮细胞中的表达及其对小鼠关节炎模型的基因治疗研究. *生物工程学报*, 2006, **22**(3): 378-383.
- [5] Brightling C, Berry M, Amrani Y, *et al.* Targeting TNF- α : A novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, **121**(1): 5-10.
- [6] Erin EM, Leaker BR, Nicholson GC, *et al.* The effects of a monoclonal antibody directed against tumor necrosis factor-alpha in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, **174**(7): 753-762.
- [7] Rouhani FN, Meitin CA, Kaler M, *et al.* Effect of tumor necrosis factor antagonism on allergen-mediated asthmatic airway inflammation. *Respir Med*, 2005, **99**(9): 1175-1182.
- [8] Gutierrez MA, Lizarralde PE, Martinez OP, *et al.* Tuberculous peritonitis in a patient with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Clin Rheumatol*, 2007, **26**(3): 452-453.
- [9] Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, *et al.* Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*, 2006, **295**(21): 2482.
- [10] Moreland LW, Weinblatt ME, Keystone EC, *et al.* Etanercept treatment in adults with established rheumatoid arthritis: 7 years of clinical experience. *J Rheumatol*, 2006, **33**(5): 854-861.
- [11] Shin IS, Baer AN, Kwon HJ, *et al.* Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes occurring with tumor necrosis factor alpha antagonist therapy. *Arthritis Rheum*, 2006, **54**(5): 1429-1434.
- [12] Peppel K, Crawford D, Beutler B, *et al.* A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent agonist of TNF activity. *J Exp Med*, 1991, **174**(6): 1483-1489.
- [13] McKay J. A soluble-blind, randomized, 6 arm, parallel-group, dose finding, double-dummy, multi-center comparison of sTNFR55IgG (Lenercept) subcutaneous to reference treatment with oral methotrexate (MTX) and their combination in patients with rheumatoid arthritis(RA)(12 week dose-finding efficacy/safety study). *Arth Rheum*, 1998, **41**(suppl.9): s132.
- [14] Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, *et al.* A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem*, 1989, **264**(20): 11974-11980.