

研究报告

*IL-1ra-Fcε*融合基因的克隆、表达及鉴定

刘中成^{1,2}, 邹民吉², 王园园², 王嘉玺², 徐东刚²

1 河北大学药学院, 保定 071002

2 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

摘要: 白细胞介素-1 与免疫球蛋白 E 在过敏性哮喘发病中发挥着重要作用。本试验克隆了白细胞介素-1 受体拮抗剂 (IL-1ra) 及 IgE 分子恒定区 cDNA 片段, 构建了融合基因原核表达载体 IL-1ra-Fcε/pBV220。将其转化大肠杆菌 BL21(DE3), 实现了融合蛋白的高效表达, Western blotting 结果表明表达蛋白为目的融合蛋白, 主要以包涵体形式存在; 利用分子筛和阳离子交换层析对表达产物进行了纯化, 纯化的包涵体复性后经体外功能试验表明, 融合蛋白的活性与 IL-1ra 没有显著性差异; 初步药代动力学分析显示 IL-1ra-Fcε 半衰期比 IL-1ra 延长了 4.78 倍。

关键词: 白细胞介素-1 受体拮抗剂 (IL-1ra), 免疫球蛋白 E (IgE), 融合基因, 鉴定, 半衰期

Cloning, Expression and Identification of *IL-1ra-Fcε* Fusion Gene

Zhongcheng Liu^{1,2}, Minji Zou², Yuanyuan Wang², Jiaxi Wang², and Donggang Xu²

1 College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China

2 Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Both interleukin-1 and IgE are important in the pathogenic mechanism of the allergy asthma. cDNA of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and IgE were cloned and a prokaryotic expression vector IL-1ra-Fcε/pBV220 was constructed. The vector was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The fusion protein was expressed successfully in the form of inclusion body. The recombinant protein of IL-1ra-Fcε was highly purified by chromatography of gel filtration and ion exchange, which was identified by Western blotting. The cell assay showed that the activity of IL-1ra-Fcε was as high as IL-1ra *in vitro* after refolding. The pharmacokinetic profile of IL-1ra-Fcε and IL-1ra was analyzed, and the half time of IL-1ra-Fcε is 4.78 times than that of IL-1ra.

Keywords: IL-1ra, IgE, fusion gene, identification, half time

过敏性哮喘是在一定遗传背景之上, 由多种因素参与的慢性气道炎症疾病, 对其发病机制仍不十分清晰。过敏性哮喘发病率与死亡率呈现逐年升高的趋势, 已成为全球性的公共卫生问题。抗炎治疗及抑制 IgE 水平升高一直是哮喘治疗的研究热点。

白细胞介素-1 (IL-1) 为体内作用较强的前炎症细胞因子之一, 在哮喘病发生、发展过程中具有重要作用^[1-3]。白细胞介素-1 受体拮抗剂 (IL-1ra) 是生物体内的一种天然蛋白分子, 与 IL-1α、IL-1β 同为 IL-1 家族成员^[4], 能特异性地与 IL-1 受体结合, 但无致

Received: February 25, 2008; Accepted: July 7, 2008

Supported by: the National Key Technology R & D Program (No. 2006BAI19B05-3).

Corresponding author: Donggang Xu. Tel: +86-10-66931087; E-mail: xudg@nic.bmi.ac.cn

国家科技支撑计划课题 (No. 2006BAI19B05-3) 资助。

炎功能,从而拮抗 IL-1 生物活性^[5,6]。研究表明, IL-1ra 具有治疗和预防哮喘的作用^[7,8]。但是由于 IL-1ra 在体内不稳定,半衰期极短,限制了他的广泛应用。免疫球蛋白 E 在哮喘发病过程中的作用早已获得公认^[9]。IgE 与其高亲和力受体的结合是触发肥大细胞、嗜碱性粒细胞脱颗粒,导致哮喘发病的关键因素^[10,11]。封闭 IgE 与其高亲和力受体的结合,即可阻断过敏反应,达到治疗哮喘的目的,以 IgE Fc 区作为靶点治疗过敏性哮喘已有大量文献报道^[10-13]。

本研究针对 IL-1ra 和 IgE 在哮喘发病中的重要作用,利用基因工程技术构建了 IL-1ra 和 IgE 分子恒定区融合基因,以其获得同时具有 IL-1ra 和 IgE 分子恒定区活性的双功能蛋白分子,同时又可延长 IL-1ra 在生物体内的半衰期,从而达到治疗哮喘的目的。为进一步探索过敏性哮喘发病机理及治疗研究提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)、质粒 pBV220 及 IL-1ra/pBV220 均为本室保存。

1.1.2 主要仪器及试剂

2400PCR 仪购自美国 PE 公司,蛋白纯化系统 Biologic Duo-Flow system 购自 Bio-Rad 公司;人脾 cDNA 文库为本室保存;Taq DNA 聚合酶, dNTP, T4 DNA 连接酶,限制性核酸内切酶 EcoR I、BamH I 购自 TaKaRa 公司;兔抗人 IL-1ra 多抗为本室保存,兔抗人 IgE 多抗购自 Santa Cruz 公司,羊抗兔 HRP-IgG 抗体购自中杉公司;PRMI 1640 培养基、FBS、MTT 均为 Invitrogen 公司产品;rhIL-2、A23187 购至 Sigma 公司;Yeast Extract 与 Trypton 购自 Oxoid 公司;IL-1ra/IL-1F₃ ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,其它均为分析纯试剂。DNA 测序由上海英骏生物公司完成。

1.1.3 动物及细胞株

雄性大耳白兔由军事医学科学院动物中心提供;EL-4、CTLL-2 均为本室保存,购自中国科学院上海细胞中心。

1.2 方法

1.2.1 人 IgE Fc3-4 基因的钓取

依据人 IgE Fc3-4 基因编码序列及表达载体

pBV220 多克隆酶切位点,设计一对引物。上游引物(5'-3'): GTGAGCGCCTACCTAAGCC, 下游引物(5'-3'): CGGGATCCTTATCATTACCGGGATTACAG, 划线部分为 BamH I 酶切位点。按照以下反应程序从人脾 cDNA 文库扩增目的基因: 94°C, 5 min; 94°C, 30 s; 58°C, 30 s; 72°C, 60 s; 25 个循环, 72°C, 7 min。纯化回收目的基因片段克隆到 pGEM-T 载体上,经测序正确后进行下一步实验。

1.2.2 IL-1ra-Fc ϵ 融合基因克隆表达载体的构建

分别以 IL-1ra/pBV220 和经测序正确的 IgE Fc3-4 为模板,以蛋白柔性较强的(Gly₄Ser)₃ 为 linker,设计引物如下: 上游引物(5'-3'): CGGAATTCATGCGACCCTCTGGGAGAAAATC; 同时根据 pBV220 载体特征对启动子 SD 序列进行优化,并将基因 3'端部分密码子更改为大肠杆菌偏性密码子,设计优化上游引物(5'-3'): CGGAATTCAATGC GTCCGTCTGGTAGAAAATC, Linker(5'-3')TCTACTCCAGGAGGACGAGGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGTGAGCGCCTACCTAAGCCG, 中间引物(5'-3'): GTGAGCGCCTACCTAAGCCG, 下游引物(5'-3'): CGGGA TCCTTATCATTACCGGGATTACAG, 斜体部分为优化序列,划线部分为 EcoR I、BamH I 酶切位点。采用两步重叠 PCR 法扩增目的基因: 首先,利用将 IL-1ra 基因与 linker 通过重叠延伸 PCR 方法扩增,所得片段经电泳回收后再次与 IgE Fc3-4 基因进行重叠延伸法扩增。目的片段经琼脂糖凝胶电泳回收纯化,经 EcoR I、BamH I 双酶切,酶切产物与质粒 pBV220 重组,转化 DH5 α , 提取质粒后酶切鉴定,筛选阳性克隆,核苷酸序列分析正确后进行表达,所得质粒命名为 IL-1ra-Fc ϵ /pBV220。

1.2.3 重组蛋白在宿主菌的表达

将测序正确的 IL-1ra-Fc ϵ /pBV220 质粒和对照质粒 pBV220 转化大肠杆菌 BL21(DE3), LB 培养基(0.1 g/L 氨苄青霉素), 30°C 培养至 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6, 水浴 42°C, 诱导表达 4.5 h, 收集菌体超声破碎,离心后分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE, 确定目的蛋白的表达与存在形式。分别以兔抗人 IL-1ra 多抗、兔抗人 IgE 多抗,利用 Western blotting 方法验证目的蛋白。

1.2.4 重组蛋白的纯化与复性

经超声破碎裂解菌体, 8000 r/min, 离心 10 min,

收集包涵体, 分别用含 1% TritonX-100 和含 2 mol/L 尿素的 PBS (pH 7.4) 缓冲液洗涤包涵体。以适量的含 8 mol/L 尿素、5 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)的 0.1 mol/L PB(pH 8.5)变性缓冲液溶解包涵体, 4°C 放置, 磁力搅拌器搅拌过夜, 使其充分溶解。12 000 r/min, 20 min 离心去除不溶物及杂质, 收集上清。过 S300 分子筛层析后, 12% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白所处洗脱峰。选择含有目的蛋白洗脱峰经 S-sepharose 阳离子柱层析(SPPF)纯化, 变性缓冲液平衡阳离子柱, 以含 100 mmol/L NaCl 变性缓冲液洗脱目的蛋白。

逐步透析法复性目的蛋白, 将纯化后的目的蛋白用变性缓冲液稀释至 0.1 mg/mL 左右, 内含 1 mg/mL 聚乙二醇(PEG)4000、精氨酸 0.4 mol/L、氧化型谷胱甘肽(GSSG)0.1 mmol/L、还原型谷胱甘肽(GSH) 1 mmol/L。分别用含有 6、4、2 和 0 mol/L 尿素的 10 mmol/L PBS (pH 8.5), 于 4°C, 搅拌透析。复性完成后对含有 25 mmol/L PMSF 的 10 mmol/L PBS (pH 7.4), 于 4°C, 搅拌透析。PEG20000 浓缩复性蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度, 然后进行活性分析。

1.2.5 重组蛋白生物学活性测定^[14]

EL-4 细胞表面高表达 IL-1 受体, 在 IL-1 刺激下 EL-4 细胞分泌 IL-2, 通过检测 IL-2 依赖细胞株 CTLL-2 存活情况可反映 IL-1 的含量变化。本实验在 EL-4/CTLL-2 IL-1 测活系统的基础上, 通过加入不同量的重组蛋白, 利用融合蛋白与 IL-1 竞争结合 EL-4 细胞表面的 IL-1 受体, 以其对 IL-1 活性的抑制作用为指标, 用 MTT 法测定 CTLL-2 存活情况间接测定 IL-1ra 的生物学活性。操作过程如下: 纯化后的重组蛋白用完全培养基进行梯度稀释, 以完全培

养基作为对照, 依次加入 96 孔板, 每孔 50 μ L, 每个样品重复 3 次, 然后依次加入钙调蛋白 A23187(终浓度为 5×10^{-7} mol/L), IL-1 (10 u/mL) 100 μ L, 处于对数生长期的 EL-4 细胞(2×10^6 /mL) 100 μ L, 总体积 250 μ L, 37°C, 5% CO₂ 培养箱培养过夜; 将 100 μ L 培养上清液对应转入一个新的 96 孔板, 分别加入 CTLL-2 细胞(1×10^5 /mL)100 μ L, 培养 20 h; 每孔加入 100 μ L MTT(5 mg/mL), 37°C 孵育 4 h, 然后每孔加入 100 μ L 酸化 10% SDS; 使用酶联仪测 570 nm 波长光吸收, 比较不同样品对 CTLL-2 细胞存活的影响, 而确定其体外细胞活性。同时以相同浓度的 IL-1ra 作为阳性对照, 比较二者之间的差异。

1.2.6 初步药代动力学分析

选择雄性大耳白兔, 皮下注射给药, 分别注射等量的 IL-1ra 和 IL-1ra-Fc ϵ , 注射剂量为 200 μ g/kg, 分别于注射后 0.25 h、0.5 h、1.0 h、2.0 h、3.0 h、4.0 h、5.0 h、6.0 h、8.0 h、12.0 h、24.0 h、48.0 h 经耳缘静脉采血 400 μ L, 1% 肝素钠抗凝, 血液于 4°C 放置 10 min 后, 5000 r/min, 离心 10 min, 收集血浆, -20°C 保存备用。按 IL-1ra/IL-1F3 ELISA 试剂盒说明检测不同时间点血浆中 IL-1ra 浓度。以 Excel 2003 绘制血药-时间曲线, 采用统计矩方法进行初步药代动力学分析。

2 结果

2.1 IL-1ra-Fc ϵ 融合基因的克隆

分别将以 IL-1ra/pBV220 为模板扩增的 IL-1ra 基因(456 bp)和从人脾 cDNA 文库中钓取的 Fc ϵ 3-4 基因(639 bp)与直接合成的 linker 经两次重叠延伸 PCR, 获得融合基因全长(1140 bp)。克隆到 pGEM-T

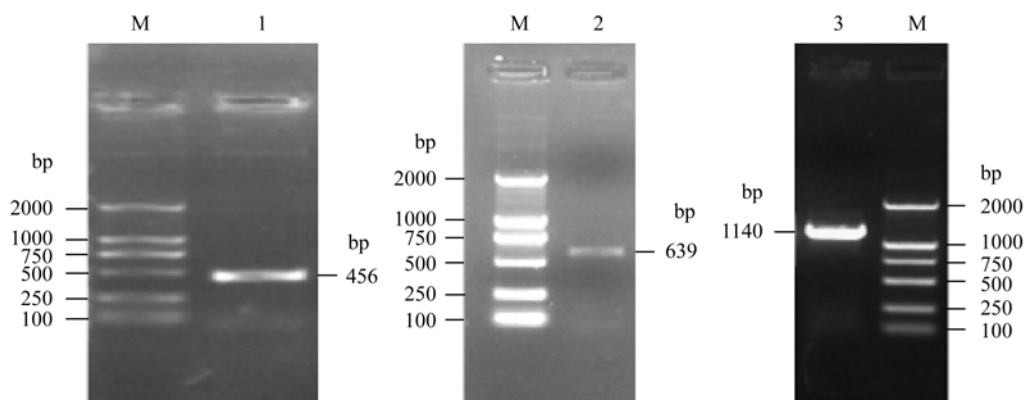


图 1 IL-1ra 基因、Fc ϵ 3-4 和融合基因 IL-1ra-Fc ϵ 的 PCR 产物鉴定

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis PCR products of IL-1ra, Fc ϵ 3-4 and IL-1ra-Fc ϵ fusion gene

M: DL2000 marker; 1: IL-1ra gene; 2: Fc ϵ 3-4 gene; 3: IL-1ra-Fc ϵ fusion gene

载体上,转入大肠杆菌 DH5 α , 随机挑取阳性克隆,经测序后与 GenBank 提供序列相一致。

2.2 IL-1ra-Fc ϵ /pBV220 融合基因表达载体的构建

测序正确后,用 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切 pBV220 载体及目的片段,连接,转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆提取质粒,进行双酶切鉴定,获得 1140 bp 目的条带,与预期结果一致,成功构建 IL-1ra-Fc ϵ /pBV220 融合基因表达载体(图 2)。

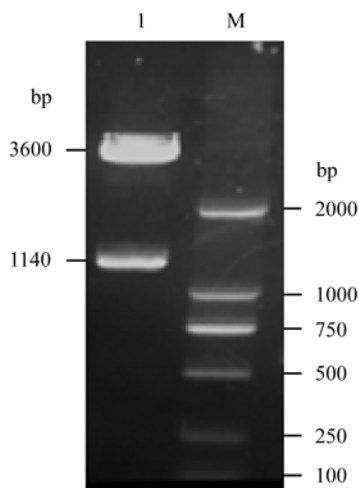


图 2 重组质粒 IL-1ra-Fc ϵ /pBV220 的酶切图谱

Fig. 2 Digestion analysis of recombinant plasmid IL-1ra-Fc ϵ /pBV220

L: IL-1ra-Fc ϵ /pBV220 digested by *Bam*H I/*Eco*R I;
M: DL2000 marker

2.3 IL-1ra-Fc ϵ 融合蛋白的表达

将融合基因 3'端密码子经过优化和未优化的 IL-1ra-Fc ϵ /pBV220 质粒以及 pBV220 质粒分别转入表达宿主菌 BL21, 42°C 诱导表达 4.5 h。菌体超声破碎,离心后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。从图 3 中可看出空载体中没有目的蛋白的表达,密码子经优化和未经优化的载体表达没有明显差异,目的蛋白主要以包涵体形式存在,约占全菌表达量的 38.2%, 分子量为 44 kD 左右,与预期目的蛋白分子量一致(图 3)。

2.4 IL-1ra-Fc ϵ 融合蛋白纯化与鉴定

将包涵体溶解后,经 S300 分子筛层析和 S-sepharose 阳离子柱层析纯化后,经 SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白,结果显示,在大约 44 kD 附近的位置出现了一条蛋白条带,薄层扫描测定目的蛋白纯度在 90%以上(图 4)。分别用兔抗人 IL-1ra 多抗及兔抗人 IgE 多抗对纯化的重组蛋白进行 Western

blotting 鉴定(图 5), 可见在相应位置处有一阳性反应条带。

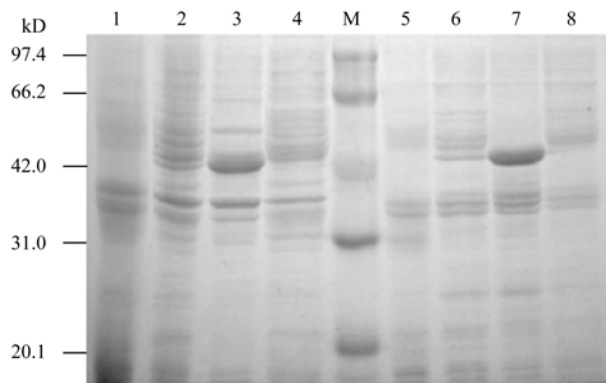


图 3 IL-1ra-Fc ϵ 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the IL-1ra-Fc ϵ expression

M: protein marker; 2, 3: improved gene; 6-8: unimproved gene;
1, 5: whole lysate of bacterial with pBV220; 2, 6: whole lysate of bacterial with IL-1ra-Fc ϵ /pBV220; 3, 7: precipitate of the bacterial lysate with IL-1ra-Fc ϵ /pBV220; 4, 8: supernatant after lysis of bacteria with IL-1ra-Fc ϵ /pBV220

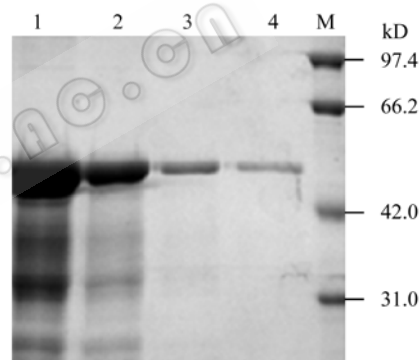


图 4 融合蛋白 IL-1ra-Fc ϵ 纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified IL-1ra-Fc ϵ fusion protein

M: protein marker; 1, 2: purified IL-1ra-Fc ϵ by S300;
3, 4: purified IL-1ra-Fc ϵ by SPFF

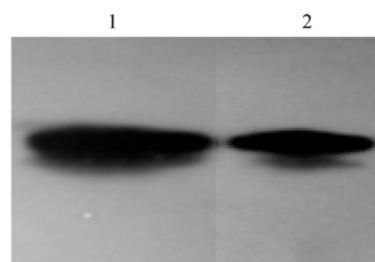


图 5 纯化的融合蛋白 IL-1ra-Fc ϵ Western blotting 鉴定结果

Fig. 5 Western blotting analysis of purified fusion protein IL-1ra-Fc ϵ

1: anti-IL-1ra; 2: anti-Fc ϵ

2.5 IL-1ra-Fc ϵ 融合蛋白体外细胞活性测定

MTT 法检测结果表明,随着 IL-1ra 和 IL-1ra-

Fcε浓度的增大, OD_{570} 呈逐渐降低的趋势, 显示存活的 CTLL-2 细胞逐渐减少。表明重组 IL-1ra-Fcε能够与 IL-1 竞争结合 EL-4 细胞膜表面上的 IL-1 受体, 使得 IL-2 的合成减少, 造成依赖 IL-2 的 CTLL-2 细胞死亡。统计学分析显示 IL-1ra 和 IL-1ra-Fcε的生物学活性之间无统计学差异。

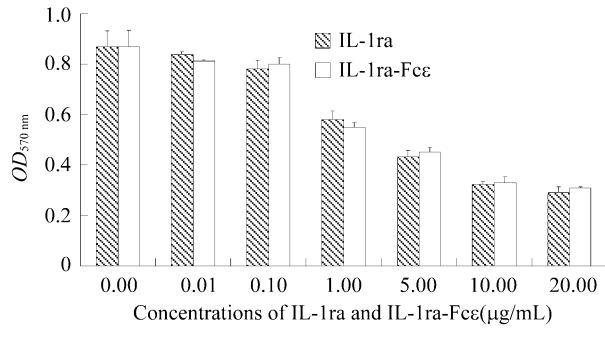


图 6 不同剂量 IL-1ra 和 IL-1ra-Fcε对 CTLL-2 细胞增值影响的比较

Fig. 6 Comparison of the effects of IL-1ra and IL-1ra-Fcε on increment rate of CTLL-2 at different concentrations

2.6 药代动力学分析

根据 ELISA 测定的各时间点血浆中样品浓度,

绘制血药浓度-时间曲线(图 7), 以统计矩方法分析结果。如图 7 所示, 皮下注射 1 h 后, IL-1ra 和 IL-1ra-Fcε在血浆中的浓度均达到最高, 并呈逐渐降低的趋势。IL-1ra 浓度于 12 h 后低于试剂盒检测限以下; 而 IL-1ra-Fcε融合蛋白在 24 h 时浓度为 32.65 pg/mL, 48 h 时未检测到 IL-1ra-Fcε分子。具体动力学参数见表 1, IL-1ra-Fcε半衰期达到 13.40 h, 与 IL-1ra 半衰期 2.80 h 相比提高了 4.78 倍, 代谢稳定性显著提高, 与预期结果相吻合。

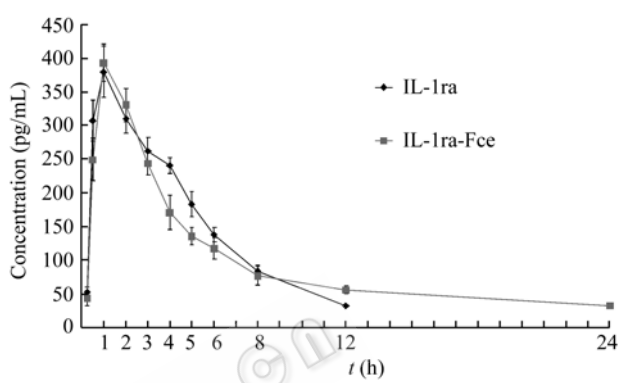


图 7 IL-1ra 和 IL-1ra-Fcε血药浓度一时间曲线图

Fig. 7 Plasma concentration-time profiles of IL-1ra and IL-1ra-Fcε

表 1 IL-1ra 及 IL-1ra-Fcε的药代动力学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of IL-1ra and IL-1ra-Fcε administered to rabbit

	C_{max} (pg/mL)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC(0.25-inf) (pg · h/mL)	MRT (h)
IL-1ra	372 ± 40.13	1.0	2.80 ± 0.58	3994.83 ± 386.67	4.76 ± 0.86
IL-1ra-Fcε	393 ± 28.52	1.0	13.40 ± 1.27	5287.58 ± 574.15	14.68 ± 2.45

3 讨论

炎性细胞浸润和炎性因子增加是过敏性哮喘的主要病理症状之一, 炎性作用与哮喘发病机制密切相关。IL-1 是体内作用较强的致炎因子, 研究表明 IL-1 是促进哮喘发病的关键因子之一。IL-1ra 作为唯一的 IL-1 天然受体拮抗剂, 在调节免疫、抑制炎症方面发挥了重要作用, IL-1ra 可通过拮抗 IL-1 的生物学效应达到治疗哮喘的作用。2001 年, 由 Amgen 公司生产的重组人白细胞介素-1 受体拮抗剂(专利名称为 Kineret)被 FDA 和欧洲 EMEA 批准上市, 用于治疗 RA, 但是由于 IL-1ra 在体内不稳定, 而且微量的 IL-1 就可以引起完全的生物学效应, 在疾病治疗过程中 rhIL-1ra 的用量高达 100~150 mg/d, 频繁

用药加重了病人的身体、心理和经济负担^[15-17]。蛋白融合是延长药物半衰期的最有效的方法之一, 因此本研究采用融合策略以延长 IL-1ra 的半衰期。

免疫球蛋白 E 在速发型变态反应中的作用早已获得公认。研究证实, IgE-FcCε2 区域对于 IgE 与其受体 FcεRI 的结合只具有一定的调节作用, Cε3-Cε4 是与其受体 FcεRI 结合的关键位点。所以本研究利用基因工程技术将 IL-1ra 和 IgE 的 Fc3-4 区构建融合蛋白, 以期形成具有双重功能的新型蛋白, 一方面可以延长 IL-1ra 在体内的半衰期, 另一方面利用 IgE 的 Fc 封闭 IgE 的受体, 抑制肥大细胞、嗜碱性粒细胞脱颗粒, 从而达到防治哮喘的目的。

有关 IgE 的 Fc 区体外表达已有大量研究, 但此蛋白疏水性较强, 原核表达中大多以包涵体形式存

在, 复性后很难恢复活性^[18,19]。所以大部分 IgE 的 Fc 区均在哺乳动物细胞表达, 技术难度较大及费用较高, 不适合大量表达。本研究将在大肠杆菌中易于可溶性表达的 IL-1ra 与 IgE 的 Fc 区融合后, 表达产物仍以包涵体形式存在, 我们曾对不同的原核表达载体和菌株进行了筛选, 但仍未实现可溶性表达。pBV220 为温控性表达载体, 具有启动能力强、操作简单、经济的特点, 我们通过对不同表达条件及温度进行了摸索, 表达产物均为包涵体, 但 42°C 诱导时融合蛋白产率最高。我们在复性体系中除加入常用的 GSSG/GSH 氧化还原体系外, 还加入了 PEG4000, 精氨酸, 并采用逐步降低尿素浓度的方法, 使融合蛋白较好的恢复活性。经 EL-4/CTLL-2 细胞评价体系显示蛋白复性良好, 与 IL-1ra 生物学活性没有显著性差异。

经典药物动力学是以房室模型理论为基础的研究方法, 参数估算所需公式多而复杂, 且模型确定受试验设计和血药浓度检测方法影响, 有时一种药物以不同途径给药或检测方法不同时, 可以有不同的隔室模型。统计矩理论是研究随机现象的一种数学方法, 1978 年 Yamaoka 和 Cutler 同时报道统计矩用于药物动力学研究。研究表明 IL-1ra 代谢途径符合线性药物动力学特征, 所以本研究以统计矩方法分析药物代谢动力学, 与经典药物动力学研究方法相比, 本法更简便、可靠、实用且易于掌握^[20]。本实验采用 ELISA 方法直接测定血药浓度, 方法灵敏较高, 实验中设计了 13 个采样点, 但 12 h 后既检测不到 IL-1ra 分子, 24 h 后检测不到 IL-1ra-Fc ϵ 分子, 实验结果与预期目标相符, 证实了 IL-1ra-Fc ϵ 半衰期显著长于 IL-1ra。

由于人嗜碱性粒细胞本身不易提取, 获得特异性致敏原也具有较大的难度, 另外, IgE 分子 Fc 区种属差异较大, 人 IgE 分子不能与其他种属嗜碱性粒细胞相结合, 所以体外评价 IgE 分子与其表面受体结合较困难^[21]。Tanaka 等通过构建稳定表达人 Fc ϵ RI 的细胞株, 在体外评价了 IgE 分子与其高亲和力受体的结合^[22]。由于条件所限, 本研究中仅评价了融合蛋白 IL-1ra 部分活性, 未对 IgE Fc 区部分活性进行评价。另外, 有关此融合蛋白具体的治疗功能还需大量的研究来分析, 以期深入了解变应性哮喘病发病机理及哮喘病治疗提供新的途径和方法。

REFERENCES

- [1] Arend WP. The role of interleukin-1 receptor antagonist in the prevention and treatment of disease. *Mod Rheumatol*, 2003, **13**: 1-6.
- [2] Mao XQ, Kawai M, Yamashita T, *et al.* Imbalance production between interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) in bronchial asthma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **276**: 607-612.
- [3] Nicole S, Michael K, Manfred K. The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. *Eur J Immunol*, 2003, **33**: 991-1000.
- [4] Dinarello CA. Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991, **77**(8): 1627-1552.
- [5] Henning G, Thomas I, Margret B, *et al.* Association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, **169**: 1217-1223.
- [6] Iona E, Dower SK, Francis SE, *et al.* Action of intracellular IL-1Ra (Type1) is independent of the IL-1 intracellular signalling pathway. *Cytokine*, 2006, **33**(5): 274-280.
- [7] Keane AM, Miyazaki D, Liu G, *et al.* Prevention of allergic eye disease by treatment with IL-1 receptor antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, **40**(12): 3041-3046.
- [8] Okada S, Inoue H, Yamauchi K, *et al.* Potential role of interleukin-1 in allergen induced late asthmatic reactions in guinea pigs: suppressive effect of interleukin-1 receptor antagonist on late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immunol*, 1995, **95**(6): 1236-1245.
- [9] Thomas AE. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **164**(8): s125.
- [10] Chang TW, Shiung YY. Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, **117**(6): 1203-1213.
- [11] Rosenwasser LJ. New immunopharmacologic approaches to asthma: role of cytokine antagonism. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, **105**(2): 586-591.
- [12] Zhu DC, Kepley CL, Zhang M, *et al.* A novel human immunoglobulin Fc γ -Fc ϵ bifunctional fusion protein inhibits Fc ϵ RI-mediated degranulation. *Nat Med*, 2005, **11**(4): 446-449.
- [13] Zhu DC, Kepley CL, Zhang K, *et al.* A chimeric human-cat fusion protein blocks cat induced allergy. *Nat Med*, 2005, **11**(4): 446-449.
- [14] Simon PL, Laydon JT, Lee JC. A modified assay for interleukin-1 (IL-1). *J Immunol Methods*, 1985, **84**(1-2): 85-94.
- [15] Bendele A, McAbee T, Woodward M, *et al.* Effects of interleukin-1 receptor antagonist in slow release hylan vehicle rat typeII collagen arthritis. *Pharm Res*, 1998, **15**(10): 1557-1561.
- [16] Bendele A, McAbee T, Sennello G, *et al.* Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in

- animal models with human clinical data. *Arthritis Rheum*, 1999, **42**(3): 498–506.
- [17] Kopp WC, Urba WJ, Rager HC, *et al.* Induction of interleukin 1 receptor antagonist after interleukin1 therapy in patients with cancer. *Clin Cancer Res*, 1996, **2**(3): 501–506.
- [18] Helm BA, Sayers I, Higginbottom A, *et al.* Identification of the high affinity receptor binding region in human immunoglobulin E. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 7494–7500.
- [19] Ishizaka T, Helm B, Hakimi I, *et al.* Biological properties of a recombinant human immunoglobulin ϵ -chain fragment. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1986, **83**: 8323–8327.
- [20] Riegelman S, Collier P. The application of statistical moment theory to the evaluation of tin vivo dissolution tiom, and absorption time. *J Pharm Sci*, 1980, **8**: 509–535.
- [21] Hellman L, Pettersson U, Engström A, *et al.* Structure and evolution of the heavy chain from rat immunoglobulin E. *Nucleic Acids Research*, 1982, **10**(19): 6441–6449.
- [22] Tanaka Y, Takagaki Y, Nishimune T. Effects of metal elements on beta-hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1991, **39**(8): 2072–2076.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

生物技术产业化——从实验室到工厂到产品（译）

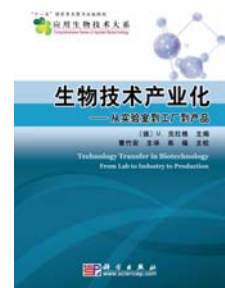
Technology Transfer in Biotechnology From Lab to Industry to Production

〔德〕U 克拉格主编 曹竹安主译 高福主校

978-7-03-021732-5 ¥58.00 2008年9月出版

本书结合生物化工领域前沿进展，涵盖了工业生物技术工程化或产业化主要单元的共性技术，展示了近年来一些取得重大进展并有重要应用前景的工业生物技术成果及发展趋势。主要内容包括微生物发酵及相关反应器开发，阐述了高压发酵中传氧、传热以及二氧化碳抑制和动力、能量成本的核算理论；从理论阐述到应用实例，展示了平行反应器系统、膨胀床吸附的生物化学工程研究技术；并进而概述了进行微生物发酵代谢流分析的方法和进展。酶催化及酶膜反应器：论述了生物学原理在不对称催化中的应用，比较了不同辅因子再生体系的优缺点，阐述了酶催化的区域选择性和立体选择性，结合 Degussa 开发的膜反应器概述了其研究进展及应用实例。针对工业生物技术产业下游处理，阐述了厌氧废水处理的工程问题和工艺进展，比较了不同萃取体系用于初级和次级代谢产物分离的进展和发展趋势。

本书可作为分子生物学、生物工程、生物技术以及医学、药学等领域的高等院校和科研院所的教学和科研人员的参考用书。



生物催化剂与酶工程（译）

Biocatalysts and Enzyme Technology

〔德〕K 布赫霍尔茨 V 卡谢 UT 博恩舒尔等编著

魏东芝 马昱澍 马兴元等译

978-7-03-022195-7 ¥65.00 2008年9月出版

生物催化剂和酶工程是生物工程的重要研究和应用领域，本书将为读者带来人类应用生物催化剂的历史，酶的催化原理、动力学、产量、循环、特性以及设计方法等知识。不仅涵盖了常用的可溶性酶，也着重介绍了新式的固定化酶在有机合成、生物反应器设计和反应工程中的应用。每一章都有大量的应用实例，章末还设有习题以帮助读者更好地学习这门令人兴奋的学科。

本书适合于生物化学、生物催化工程、发酵生产等领域的研究者和技术人员使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>