

# 人 IL-35 单克隆抗体制备及其在定量 ELISA 检测方法中的应用

何峰容<sup>1,2</sup>, 孙颖<sup>2</sup>, 乐鑫<sup>2</sup>, 刘勇<sup>2</sup>, 刘梦元<sup>1,2,3</sup>

1 湖北大学 生命科学学院 生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 武汉云克隆科技股份有限公司, 湖北 武汉 430056

3 药物高通量筛选国家与地方联合工程研究中心, 湖北 武汉 430062

何峰容, 孙颖, 乐鑫, 等. 人 IL-35 单克隆抗体制备及其在定量 ELISA 检测方法中的应用. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1723-1735.

He FR, Sun Y, Yue X, et al. Preparation of monoclonal antibodies against human interleukin-35 and their application in a quantitative ELISA for interleukin-35 detection. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1723-1735.

**摘要:** 为了建立人白细胞介素-35 (IL-35) 的定量 ELISA 检测方法, RT-PCR 克隆了人 IL-35 的 IL-27EBI3 亚基和 IL-12p35 亚基的编码基因, 在大肠杆菌中实现了 2 个亚基的高效表达。以大肠杆菌表达的 IL-27EBI3 和 IL-12p35 重组蛋白作为免疫原, 免疫 BaLb/c 小鼠, 选取阳性血清小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞融合, 用间接 ELISA 和有限稀释法进行单克隆杂交瘤细胞的筛选和克隆, 获得了稳定分泌抗 IL-27EBI3 和抗 IL-12p35 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。在效价测定和特异性鉴定的基础上, 进一步筛选出一株能稳定分泌抗 IL-27EBI3 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 3B11 和一株能稳定分泌抗 IL-12p35 单克隆抗体杂交瘤细胞株 3A10, 亚类鉴定两株单抗均为 IgG1。应用单抗 3B11 和 3A10 建立了 IL-35 双抗夹心定量 ELISA 检测方法, 借助生物素-亲和素放大效应, 该方法检测 IL-35 线性范围为 3.12–200 pg/mL, 最低检测限为 1.26 pg/mL, 与多种其他抗原的交叉反应率为 0.1%, 批内相对标准偏差 (RSD) 为 5.1%–5.6%, 批间 RSD 为 5.6%–7.2%, 添加回收率为 89%–103%, 达到定量分析的要求, 为进一步组装 IL-35 定量 ELISA 检测试剂盒打下了基础。

**关键词:** 人白细胞介素 IL-35, 单克隆抗体, 定量 ELISA, 试剂盒

**Received:** April 8, 2019; **Accepted:** July 9, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30973669/H3004), Key Science-Technology Foundation of Hubei Provincial Department of Education (No. D20141002).

**Corresponding author:** Mengyuan Liu. Tel: +86-27-88661237; Fax: +86-27-88666106; E-mail: liumengy@tom.com

国家自然科学基金 (No. 30973669/H3004), 湖北省教育厅重点研究计划项目 (No. D20141002) 资助。

网络出版时间: 2019-07-22

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190722.0917.001.html>

# Preparation of monoclonal antibodies against human interleukin-35 and their application in a quantitative ELISA for interleukin-35 detection

Fengrong He<sup>1,2</sup>, Ying Sun<sup>2</sup>, Xin Yue<sup>2</sup>, Yong Liu<sup>2</sup>, and Mengyuan Liu<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

<sup>2</sup> Wuhan Coud-clone Science and Technology Co. Ltd, Wuhan 430056, Hubei, China

<sup>3</sup> National and Local Joint Engineering Research Center of High-throughput Drug Screening Technology, Wuhan 430062, Hubei, China

**Abstract:** To establish a quantitative ELISA for human interleukin-35 (IL-35) detection, we cloned cDNAs encoding the 2 subunits IL-27EBI3 and IL-12p35 of IL-35 by RT-PCR and transformed the cDNAs into *Escherichia coli* BL21 star (DE3) by recombinant DNA technology. IL-27EBI3 and IL-12p35 were expressed as recombinant proteins and used as immunogen to immunize Balb/c mice. Spleen cells from the positive serum mice were isolated and fused with SP-2/0 myeloma cells. We obtained the hybridoma cell lines stably secreting target antibodies by indirect ELISA screening of the cell supernatants with recombinant IL-27EBI3 and IL-12p35 as antigen and consecutive subcloning of the cells in the well with positive supernatant. Following further measurement of supernatant titers of the antibodies and identification of their antigen specificity, we obtained a hybridoma cell line 3B11 that stably secretes antibody against IL-27EBI3 and a hybridoma cell line 3A10 that secretes antibody against IL-12p35. Both monoclonal antibodies (mAbs) were identified as the subtype of IgG1. Finally, using the anti-IL-27EBI3 mAb from 3B11 as the capture antibody and the anti-IL-12p35 mAb from 3A10 as the secondary antibody, we established a quantitative double-antibodies sandwich ELISA for IL-35 detection with streptavidin-biotin amplification system. Results demonstrated that the quantitative assay had a detection range of 3.12–200 pg/mL, a detectability of 1.26 pg/mL, and a crossing-reactive rate of 0.1%. The intra-batch RSD and the inter-batch RSD of the quantitative assay were 5.1%–5.6% and 5.6%–7.2%, respectively, and the fortified recovery was 89%–103%. Therefore, the sandwich ELISA assay for IL-35 meets the qualification of quantitative analysis and laid a stable foundation for the development of quantitative ELISA kit for IL-35 detection.

**Keywords:** human interleukin-35, monoclonal antibody, quantitative ELISA, kit

白细胞介素 IL-35 是最新发现的 IL-12 细胞因子家族的成员,是由 IL-12 家族  $\alpha$  链 p35 (IL-12p35) 和一个  $\beta$  链 EBI3 组成的异源二聚体蛋白<sup>[1]</sup>。p35 亚基在人体内广泛组成型表达,可与 p40 组成 IL-12。EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 诱导基因 3 (EBI3) 是 IL-12 的 p40 亚基同源物,最初在被 EB 病毒感染的 B 细胞中发现,可与 IL-12 家族的 p28 组成 IL-27,因而也称为 IL-27EBI3。IL-35 由调节性 T 细胞 (Regulatory T cell, Treg) 分泌,在 T 细胞分化中扮演着重要的角色<sup>[2]</sup>,可刺激 Treg 的增殖,抑制效应性 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖,抑制 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为 Th17 效应细胞,是继 TGF- $\beta$ 、IL-10、IL-27 之后发现的一个新型免疫抑制性细胞因子<sup>[3-4]</sup>。IL-35

在肿瘤、自身免疫病和感染性疾病发挥着重要的免疫调节作用<sup>[5-9]</sup>。在肿瘤微环境中,IL-35 可有效抑制 T 细胞对肿瘤的免疫应答,IL-35 还可通过趋化髓源性抑制细胞 (MDSC) 在肿瘤内聚集并促进肿瘤的血管形成,从而促进肿瘤的生长和免疫逃逸<sup>[2,10]</sup>。在自身免疫性疾病如类风湿关节炎 (RA) 中,IL-35 通过扩增 Tregs,抑制 Th1 和 Th17 效应细胞的分化和免疫应答,减少 TNF- $\alpha$  和 IL-17 的分泌,有效减轻关节炎症<sup>[11-12]</sup>。在感染性疾病中,IL-35 则发挥着双重作用,急性感染时,IL-35 可明显诱导 Th1 细胞清除感染,同时扩增 Tregs 并抑制 Th17 细胞分化;慢性感染时,扩增的 Tregs 则表现为抑制效应性 CD4<sup>+</sup> T 细胞,防止过度免疫损伤的发生<sup>[11]</sup>。越来越多的研究证实人血清 IL-35

的水平与多种疾病的发生、发展和预后相关。肿瘤患者血清中的 IL-35 升高而自身免疫疾病患者血清 IL-35 降低,提示 IL-35 可能成为相关疾病的诊断和监测标志物。事实上,IL-35 是多种恶性肿瘤的早期诊断和预后标志物,也是多种恶性肿瘤潜在的治疗靶点<sup>[13-18]</sup>。类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)RA 患者血清 IL-35 水平显著低于健康人群,抗 TNF- $\alpha$  治疗可有效诱导 RA 患者 Tregs 的增殖,上调血清 IL-35 的水平,血清 IL-35 水平的变化可作为监测 RA 病情和评价治疗效果的参考指标<sup>[19-20]</sup>。乙型肝炎病毒 (HBV) 感染可显著提升血清 IL-35 水平,有证据表明 IL-35 参与 HBV 导致的肝硬化形成,故 IL-35 水平可作为乙型肝炎疾病进展和药物疗效的重要评价指标<sup>[21-22]</sup>。这些资料表明,IL-35 的定量检测不仅对其生物学功能的基础研究具有重要意义,而且对肿瘤、自身免疫疾病及感染性疾病的诊断、药物疗效和预后的评价同样具有重要的意义。

IL-35 是一个新发现的细胞因子,市面上针对 IL-35 的检测工具很少,目前主要依赖进口。我们制备了 IL-35 两个亚基 IL-12p35 和 IL-27EBI3 的重组蛋白,通过单克隆抗体杂交瘤技术获得了针对 IL-12p35 和 IL-27EBI3 的单克隆抗体,建立了 IL-35 双抗夹心定量检测方法,并对该检测方法的各项性能进行了综合评价,为进一步组装成 IL-35 的定量检测试剂盒打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒,菌株和细胞株

原核表达载体 pTS 为本实验构建和保存。大肠杆菌 Top10 (用于分子克隆和质粒保存),大肠杆菌 BL21 star (DE3) (用于蛋白表达的宿主细胞)均购自天根生化科技(北京)有限公司。SP2/0 购自中国典型培养物保存中心,并由实验室传代保存。人脐静脉内皮细胞 (HUEVC) 购自武汉原生

原代生物科技有限公司。

### 1.2 试剂与动物

重组人 IL-35、IL-12、IL-23、IL-27、IL-6、IL-10 及 TNF- $\alpha$  购自 Peprotech 公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Pfu* DNA 多聚酶、AMV 反转录酶、DNA 回收试剂盒、RNA 提取试剂盒购自大连宝生物 (TaKaRa)。Ni-NTA 亲和层析凝胶、A 蛋白亲和层析凝胶购自 Pharmacia 公司。弗氏完全佐剂购自 Sigma 公司。单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购自 Proteintech 公司。水溶性生物素化试剂 N-羧基磺酸基琥珀生物素 (Sulfo-NHS-Biotin) 及亲和素标记的辣根过氧化物酶 (Streptavidin-HRP) 购自 Thermo Fisher Scientific。雌性 Balb/c 小鼠购自湖北省疾病预防控制中心,用标准的啮齿动物饲料进行喂养,所有相关实验动物的操作严格按照国家科技部发布的《实验动物管理条例》进行。

### 1.3 细胞培养和 RNA 的提取

用含 10% 小牛血清的 ECM 培养基 (Sciencell) 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养脐静脉内皮细胞 (HUEVC),待细胞 90% 汇合时,加入 1 ng/mL 的 TNF- $\alpha$ ,继续培养 12 h,胰酶消化,收集细胞。用 RNA 提取试剂盒提取 HUEVC 细胞总 RNA,具体操作按照试剂盒说明书进行。

### 1.4 IL-27EBI3 和 IL-12p35 基因的克隆

根据 GenBank 中 IL-27EBI3 已知序列(GenBank Accession No. NM\_005755.2) 和 IL-12p35 已知序列 (GenBank Accession No. NM\_000882.3) 设计扩增 IL-27EBI3 和 IL-12p35 编码基因的引物,引物如表 1 所示。在 PCR 反应管中加入 HUEVC 细胞总 RNA 5  $\mu$ L, 70 °C 作用 5 min 后冷却至 0 °C,依次加入超纯水 9.5  $\mu$ L, 5 $\times$ AMV 缓冲液 5  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 2.5  $\mu$ L, RNasin 1  $\mu$ L 和 AMV 反转录酶 1  $\mu$ L,于 50 °C 反转录 60 min, 95 °C 5 min 灭活反转录酶。在 PCR 反应管中加入超纯水 34  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu$ L, 反转录产物 2  $\mu$ L, dNTPs

表 1 扩增 IL-27EBI3 和 IL-12p35 编码序列的引物

Table 1 Primers used for amplification of the nucleotide sequences of IL-27EBI3 and IL-12p35

Primers	Sequences (5'-3')
P1	Sense: <b>CCG</b> <u>CTCGAGAGGAAAGGG</u> CCCCCAGCAGCTCTGA
P2	Anti-sense: AAT <u>GGATCCT</u> CACTACTTGCCAGGCTCATTGTGGCA
P3	Sense: <b>CCG</b> <u>CTCGAGCGACAAAGAA</u> ACCTCCCCGTGGCCACTC
P4	Anti-sense: <b>CTA</b> <u>GGATCC</u> GGAAGCATTTCAGATAGCTCG

Note: P1 and P2 are for the amplification of gene encoding IL-27EBI3, and P3 and P4 for the amplification of IL-12p35. *Xho* I and *Bam*H I restriction sites (Underlined) were introduced to the primers for cloning purpose. The protective bases are marked with bold.

(10 mmol/L) 1  $\mu$ L, 上游引物和下游引物各 1  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 25  $\mu$ L, *Pfu* DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 其中 P1、P2 扩增 IL-27EBI3 编码基因, P3、P4 扩增 IL-12p35 编码基因。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 然后 95  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 冷却至 4  $^{\circ}$ C 保存。对扩增产物及质粒 pTS 分别进行 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切, 将 IL-27EBI3 和 IL-12p35 编码基因分别连入载体 pTS 中, 形成 IL-27EBI3 表达载体 pTES 和 IL-12p35 的表达载体 pTPS, 转化大肠杆菌 Top10, 进行载体的扩增, 提取质粒进行序列测定, 确保基因的连接和序列正确, 表达载体分别转化大肠杆菌 BL21 star (DE3), 形成稳定表达 IL-27EBI3 和 IL-12p35 的基因工程重组菌株。

### 1.5 IL-27EBI3 和 IL-12p35 的表达与复性

将含有表达载体 IL-27EBI3/pTES 和含有表达载体 IL-12p35/pTPS 的大肠杆菌 BL21 star (DE3) 接种 25 mL 含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C 摇动过夜, 以 1:40 转接于 1 L 含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基, 置于 5 L 摇瓶中于 37  $^{\circ}$ C 摇动培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 继续培养 5 h, 诱导 IL-27EBI3 和 IL-12p35 的表达。培养物于 4  $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 20 min, 收获菌体, 重悬于超声缓冲液中, 超声破碎菌体, 12% SDS-PAGE 检测, 观察目标蛋白的表达情况。目标蛋白包涵体的变性及其在变性条件下的固定化 Ni<sup>2+</sup>亲和层析纯化按常规方法进

行, 并经 12% SDS-PAGE 检测。将纯化的包涵体蛋白稀释到 250  $\mu$ g/mL, 装入适当大小的透析袋, 进行逐步移除变性剂尿素的透析复性。即对 100 倍体积分别含 4、2、1 及 0 mmol/L 尿素的硼酸缓冲液 (0.9% (W/V) 硼酸, 0.3% (W/V) NaOH, pH 9.6) 从高到低分步透析, 每个尿素浓度透析 4 h, 并在含 2、1、0 mmol/L 尿素的硼酸缓冲液中加入 0.5 mol/L L-精氨酸和 GSH/GSSG (1 mmol/L/1 mmol/L) 作为复性添加剂。最后, 蛋白置于 100 倍体积 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中透析 2 次, 每次 4 h, 彻底去除残留的尿素和其他杂质, 并通过 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤除菌, 超滤浓缩, 冻干备用。

### 1.6 动物免疫

以纯化的重组蛋白 IL-27EBI3 和 IL-12p35 作为免疫原, 背部皮下分别注射 5 只 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 免疫前取血作为阴性血清对照。初次免疫剂量为 100  $\mu$ g/只, 与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化后免疫小鼠, 之后每隔 2 周以相同剂量免疫原与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化后免疫。第 4 次加强免疫 2 周后, 从小鼠尾静脉少量取血, 经间接 ELISA 检测血清抗体效价, 选效价较高的小鼠于细胞融合前 3 天经腹腔注射免疫原 100  $\mu$ g 加强免疫。断颈处死小鼠, 按文献方法分离小鼠脾细胞<sup>[23]</sup>。

### 1.7 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选

将增殖期的小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 和新鲜分

离的免疫小鼠的脾细胞按 5:1 的比例混匀,离心弃上清后加入 50%的聚乙二醇进行细胞融合,然后缓慢加入 RPMI-1640 培养基终止反应,离心弃上清,用 HAT 培养基重悬细胞,铺于 96 孔细胞培养板,置于 37 °C、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,7 d 后改用 HT 培养基继续培养。用重组蛋白 IL-27EBI3 和 IL-12p35 作为抗原,以不含外源基因的空表达载体转化的大肠杆菌 (BL21 star (DE3)) 裂解液作为阴性对照,采用间接 ELISA 对细胞培养上清进行筛选,将阳性反应孔的杂交瘤细胞进行有限稀释克隆化培养,经多次克隆化培养,直至筛选出由单个细胞繁殖而来且 ELISA 反应阳性的细胞克隆。

### 1.8 间接 ELISA

用间接 ELISA 方法进行血清抗体效价和杂交瘤细胞培养上清抗体效价的检测。具体方法如下:以重组 IL-27EBI3 和 IL-12p35 作为检测抗原,以空表达载体转化的大肠杆菌 (BL21 star (DE3)) 裂解蛋白作为阴性对照抗原,包被 96 孔 ELISA 板,1 μg/mL,100 μL/孔,4 °C 过夜,PBST 洗板 3 次,5%的脱脂奶粉 100 μL/孔封闭 2 h,PBST 洗板 3 次,于每孔加入倍比稀释血清或杂交瘤细胞培养上清,每稀释度 3 个复孔,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗板 3 次,于每孔中加入 100 μL 羊抗鼠 IgG (1:5 000),37 °C 孵育 1 h,PBST 洗板 3 次,于每孔中加入 100 μL 显色液 (1 mmol/L OPD,0.016% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),37 °C 避光孵育 10 min,加入硫酸终止反应,酶标仪读取每孔 490 nm 处吸收值 (OD<sub>490</sub>)。

### 1.9 单克隆抗体的鉴定

单克隆抗体亚型的鉴定按照试剂盒说明书进行。单克隆抗体的抗原结合特异性采用 Western blotting 检测,具体方法如下:将 5 μg 不同抗原分别点样于 0.45 μm 硝酸纤维滤膜 (美国 Pall Gelman),于 25 °C 静置晾干,以重组蛋白 IL-27EBI3 和 IL-12p35 为阳性对照,以不含外源

基因的空表达载体转化的大肠杆菌 (BL21 star (DE3)) 裂解液作为阴性对照;将膜浸泡于 5%的脱脂牛奶中 4 °C 封闭过夜,1×PBS (pH 7.4) 洗膜 3 次;将膜浸泡于含 1 μg/mL 单克隆抗体的 1×PBS (pH 7.4) 中,37 °C 孵育 2 h,1×PBS 洗膜 3 次;将膜浸泡于含 HRP 标记兔抗鼠 IgG (1:1 000 稀释) 的 1×PBS (pH 7.4) 中,37 °C 孵育 1 h,1×PBS 洗膜 3 次;加入 DAB 显色剂,待显色到理想程度,自来水冲洗终止反应。

### 1.10 单克隆抗体的收集与纯化

对筛选出的稳定分泌目标抗体的杂交瘤细胞采用 RPMI-1640 完全培养基扩大培养,收集细胞培养上清,离心去除沉渣,按常规方法用 Protein A 柱对单抗进行纯化,纯化后的抗体对 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 透析换液,超滤浓缩备用。

### 1.11 生物素标记抗体的制备

将待标记的抗体用 0.1 mol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH 8.0) 稀释到 1 mg/mL,于 2 mL 蛋白质溶液中加入 Suf-NHS-Biotin,使其终浓度为 120 μg/mL,于 25 °C 持续搅拌 24 h,向反应体系中加入 9.6 μL 1 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl,于 25 °C 持续搅拌 10 min,将反应体系转入透析袋中,于 4 °C 对 1×PBS (pH 7.4) 透析 4 h 以除去游离的生物素,将样品上 Sephadex G-25 凝胶层析柱,1×PBS 洗脱,收集蛋白质峰,超滤浓缩备用。

### 1.12 双抗夹心 ELISA 检测 IL-35 方法的建立

建立双抗夹心 ELISA 方法,即以抗 IL-27EBI3 的单克隆抗体作为包被抗体,捕获样品中的 IL-35,以生物素化的抗 IL-12p35 单克隆抗体作为检测抗体,加入亲和素化的辣根过氧化物酶 (Streptavidin-HRP) 进行偶联和信号放大,最后加入底物 TMB 显色,测定 450 nm 处的吸光值 (OD<sub>450</sub>)。首先,基于棋盘法确定最优的抗体包被浓度和生物素化抗体的工作浓度。制备抗 IL-27EBI3 的单克隆抗体包被量不同的 3 种酶联

板: 1  $\mu\text{g}/\text{孔}$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}$ )、500  $\text{ng}/\text{孔}$  (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}$ )、100  $\text{ng}/\text{孔}$  (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}$ )。每种包被量的酶联板中加入 100  $\mu\text{L}$  系列浓度的 IL-35 (200  $\text{pg}/\text{mL}$ 、100  $\text{pg}/\text{mL}$ 、50  $\text{pg}/\text{mL}$ 、25  $\text{pg}/\text{mL}$ 、12.5  $\text{pg}/\text{mL}$ 、6.25  $\text{pg}/\text{mL}$ 、3.12  $\text{pg}/\text{mL}$ )。每个浓度的 IL-35 检测孔分别采用 3 种不同浓度的生物素化抗 IL-12p35 单克隆抗体 (500  $\text{ng}/\text{mL}$ 、100  $\text{ng}/\text{mL}$ 、50  $\text{ng}/\text{mL}$ )，100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。按常规方法进行夹心 ELISA 的操作，以  $OD_{450}$  值  $\geq 0.2$  为阳性 cutoff 值，观察上述不同组合方式检测 IL-35 的灵敏度，确定包被抗体的最佳使用量和生物素化抗体的最佳工作浓度。

### 1.13 定量曲线的构建

以确定的最佳用量包被抗 IL-27EBI3 的单克隆抗体于 96 孔 ELISA 板，每孔于 100  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液中，4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。PBST 洗板 3 次，5% 的脱脂奶粉 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h，PBST 洗板 3 次，加入 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  系列浓度的 IL-35 (400  $\text{pg}/\text{mL}$ 、200  $\text{pg}/\text{mL}$ 、100  $\text{pg}/\text{mL}$ 、50  $\text{pg}/\text{mL}$ 、25  $\text{pg}/\text{mL}$ 、12.5  $\text{pg}/\text{mL}$ 、6.25  $\text{pg}/\text{mL}$ 、3.12  $\text{pg}/\text{mL}$ 、1.56  $\text{pg}/\text{mL}$ 、0  $\text{pg}/\text{mL}$ )，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h。PBST 洗板 3 次，加入 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  最佳工作浓度的生物素化抗 IL-12p35 单克隆抗体，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h。PBST 洗板 3 次，加入 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  亲和素化的辣根过氧化物酶 (Streptavidin-HRP)，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。PBST 洗板 3 次，加入 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  TMB 显色液，37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 10 min。加入 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$  2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应，酶标仪测定 450 nm 吸收值 ( $OD_{450}$ )，每个 IL-35 浓度 3 复孔，取平均  $OD_{450}$ 。以  $OD_{450}$  为纵坐标，IL-35 浓度为横坐标，绘制标准曲线，用 GraphPad Prism 进行标准曲线的拟合，确定检测的线性范围和定量方程。

### 1.14 灵敏度、特异性、精密度和准确度评价

将各种待检细胞因子用样品稀释液 (1 $\times$ PBS) 稀释为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准品，蛋白定量采用 Bradford

法。然后根据下述实验要求分别稀释成相应的质控品。用上述建立的夹心 ELISA 方法测定 20 个空白样品即样品稀释液 (1 $\times$ PBS) 的  $OD_{450}$  值，将测定的平均值加上 2 倍标准差所得的值代入定量方程，所得到的样品浓度值即为该检测方法的最低检测下限 (灵敏度)。于 7 份样品稀释液 (1 $\times$ PBS) 中分别添加重组 IL-12p35、重组 IL-27EBI3、IL-12、IL-23、IL-27、IL-6、IL-10，终浓度为 20  $\text{pg}/\text{mL}$ ，每种待检细胞因子 3 复孔，用上述建立的夹心 ELISA 方法分别测定上述细胞因子浓度，取平均值，特异性用交叉反应率来表示，即实际测定浓度与实际添加浓度的比值 (%)。用该方法测定 IL-35 的高 (200  $\text{pg}/\text{mL}$ )、中 (50  $\text{pg}/\text{mL}$ )、低 (5  $\text{pg}/\text{mL}$ ) 3 个浓度的质控品，每个质控品测定 15 次，分 3 批测定，每批测定 5 次，计算检测数据的批内相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD(%)) 和批间 RSD(%), 评价检测方法的精密度 (重复性)。在含 3.6  $\text{pg}/\text{mL}$  IL-35 的稀释样品中分别添加高、中、低浓度的 IL-35，使其终浓度分别为 13.6  $\text{pg}/\text{mL}$ 、43.6  $\text{pg}/\text{mL}$  和 123.6  $\text{pg}/\text{mL}$ ，用该方法对样品中的 IL-35 进行测定，每个浓度 3 个复孔，准确度用添加回收率表示，即实测浓度平均值减去原稀释品浓度的差与实际添加浓度的比值 (%)。

## 2 结果与分析

### 2.1 IL-27EBI3 和 IL-12p35 的基因克隆、表达与制备

如图 1 所示，RT-PCR 从 TNF- $\alpha$  刺激的人脐静脉内细胞 (HUVEC) 扩增出 IL-12p35 和 IL-27EBI3 的编码基因，大小分别为 816 bp 和 759 bp。扩增产物经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切克隆至原核表达载体 pTS，获得 IL-27EBI3 表达载体 pTES 和 IL-12p35 的表达载体 pTPS (图 2A)。IL-27EBI3 和 IL-12p35 的编码基因在强启动子 T7 的控制之下，经 IPTG 诱导在大肠杆菌中获得了高效表达，

SDS-PAGE 显示表达产物以包涵体的形式存在于大肠杆菌的超声沉淀中, 分子质量大约为 25 kDa 和 29 kDa, 与理论大小一致 (图 2B、2C)。在变性条件下, 重组蛋白通过固定化的  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析一步纯化可达到 95% 以上的纯度 (图 2B、2C)。通过缓慢去除变性剂尿素的透析复性以及超滤浓缩, 可以从 1 L 大肠杆菌培养物中获得 25–30 mg 的目的蛋白, 浓度可达 1 mg/mL。

## 2.2 抗 IL-27EBI3 和抗 IL-12p35 单克隆抗体的制备和鉴定

用纯化制备的重组 IL-27EBI3 和 IL-12p35 分别免疫 5 只雌性 Balb/C 小鼠, 选择其中 3 只血清抗体效价较高的小鼠的脾细胞与 SP2/0 进行细胞融合, 获得杂交瘤细胞。以重组 IL-27EBI3 和 IL-12p35 分别作为抗原, 同时以空表达载体转化的大肠杆菌 (BL21 star (DE3)) 裂解液作为阴性对照, 用间接 ELISA 对杂交瘤细胞培养上清进行筛选, 经多轮检测和有限稀释法克隆 3 次后, 获得了 3 个稳定分泌抗 IL-27EBI3 单克隆抗体的细

胞株 3B11、3D07、3E10 和 3 个稳定分泌抗 IL-12p35 单克隆抗体的细胞株 3A10、3B09、3B12。在后续研究中, 各单克隆抗体以其来源的细胞株命名。以重组 IL-27EBI3 和 IL-12p35 作为阳性对照, 以空表达载体转化的大肠杆菌 (BL21 star

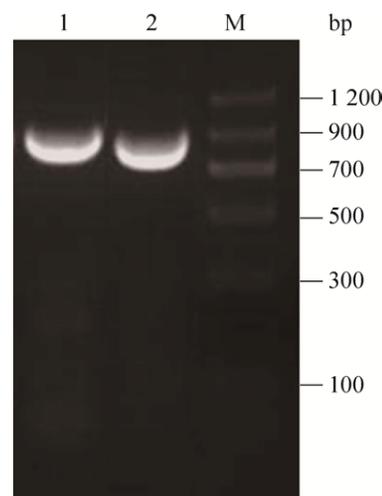


图 1 IL-27EBI3 和 IL-12p35 编码基因的 RT-PCR 克隆  
Fig. 1 RT-PCR cloning of the gene encoding IL-27EBI3 and IL-12p35. M: DNA marker (bp); 1: IL-27EBI3; 2: IL-12p35.

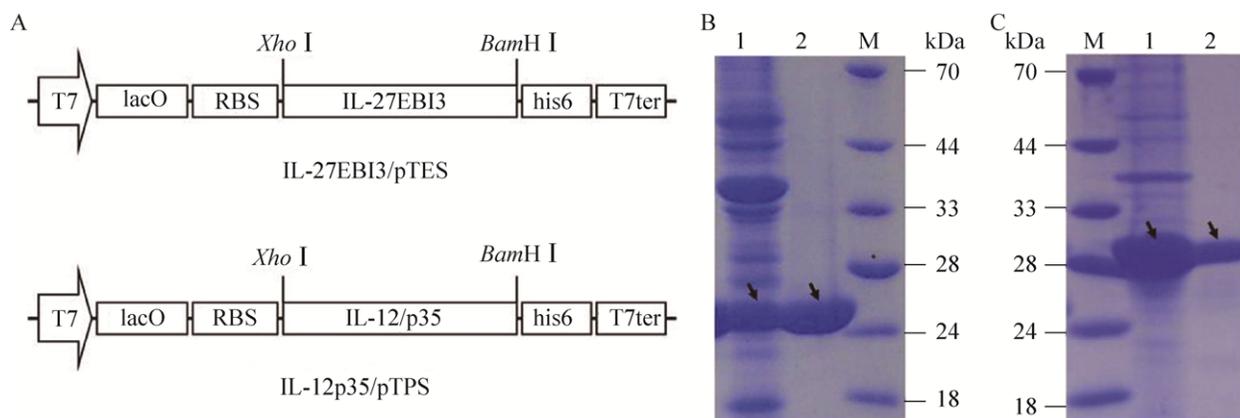


图 2 IL-27EBI3 和 IL-12p35 的表达与纯化

Fig. 2 Expression and purification of IL-27EBI3 and IL-12p35. (A) The construction scheme of the expression vector of IL-27EBI3 and IL-12p35. The gene encoding IL-27EBI3 and IL-12p35 was cloned into vector pTS via *Xho* I and *Bam*H I sites, resulting in expression vectors pTES and pTPS, respectively. (B) SDS-PAGE analysis of the expression and purification of IL-27EBI3. The arrows indicate IL-27EBI3. 1: IL-27EBI3 expressed as inclusion bodies in the cytoplasm of BL21 star (DE3); 2: purification of IL-27EBI3 by  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatograph; M: molecular mass standards (kDa). (C) SDS-PAGE analysis of the expression and purification of IL-12p35. The arrows indicate IL-12p35. 1: IL-12p35 expressed as inclusion bodies in the cytoplasm of BL21 star (DE3); 2: purification of IL-12p35 by  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatograph; M: molecular mass standards (kDa).

(DE3)) 裂解液作为阴性对照, Western blotting 对上述细胞株分泌抗体的抗原特异性进行了鉴定(表 2)。结果表明, 单抗 3B11、3D07、3E10 都能与重组 IL-27EBI3 发生免疫反应, 3B11 和 3D07 同样能与含有 EBI3 亚基的 IL-27 和 IL-35 发生免疫反应, 与不含 EBI3 亚基的 IL-12 和 IL-23 不发生免疫反应, 同时也不具备与 IL-6 和 IL-10 的免疫反应性, 而 3E10 与 IL-12 和 IL-23 都具有交叉反应。单抗 3A10、3B09、3B12 都能与重组 IL-12p35 发生免疫反应, 3A10 和 3B12 同样能与含有 p35 亚基的 IL-12 和 IL-35 发生免疫反应, 与不含 p35 亚基的 IL-12 家族成员 IL-23 和 IL-27 不发生免疫反应, 同时也不具备与 IL-6 和 IL-10 的

免疫反应性, 而 3B09 与 IL-23 具有交叉反应。对抗原特异性较好的 3B11、3D07、3A10 和 3B12 细胞株分泌抗体的效价进行了测定(图 3A), 发现单抗 3B11 效价高于 3D07, 3A10 效价高于 3B12, 因而选取单抗 3B11 和 3A10 进行后续研究。用 Protein A 柱对单抗 3B11 和 3A10 进行纯化制备, 通过一步亲和层析纯化, 纯度可达到 95% 以上(图 3B)。对纯化样品进行超滤浓缩, 蛋白浓度可达到 2 mg/mL。依照单克隆抗体亚类鉴定试剂盒的说明, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM 和 IgA 的单抗为二抗, 用夹心 ELISA 对单抗 3A10 和 3B11 进行了亚类鉴定, 发现两株单抗均为 IgG1(图 4)。

表 2 单克隆抗体的抗原特异性鉴定

Table 2 Detection of the antigenic specificity of the mAbs by Western blotting

mAbs	IL-27EBI3	IL-12p35	IL-12	IL-23	IL-27	IL-35	IL-6	IL-10	BL21(DE3) lysates
3B11	+	-	-	-	+	+	-	-	-
3D07	+	-	-	-	+	+	-	-	-
3E10	+	-	+	+	+	+	-	-	-
3A10	-	+	+	-	-	+	-	-	-
3B09	-	+	+	+	-	+	-	-	-
3B12	-	+	+	-	-	+	-	-	-

Note: "+" means there is immunoreactivity between the mAb and antigens. "-" means there is no immunoreactivity between the mAb and antigens. Recombinant IL-27EBI3 and IL-12p35 were used as positive control and the cell lysates of BL21(DE3) transformed with the blank vector was used as negative control.

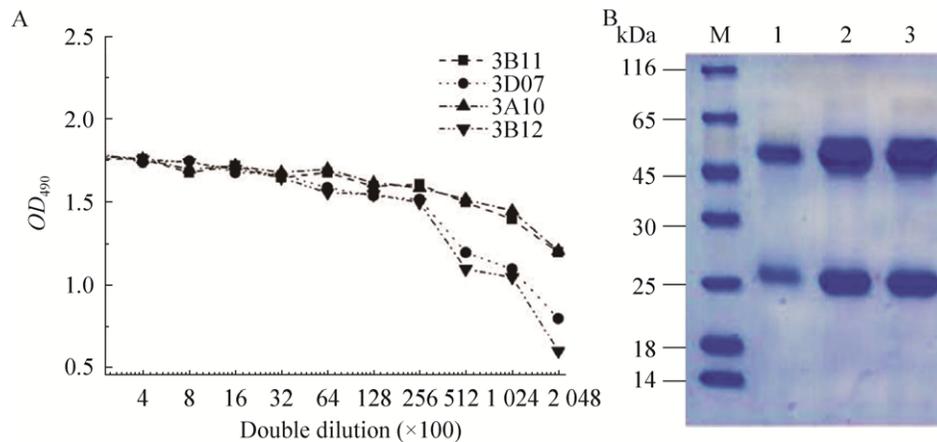


图 3 单克隆抗体的效价及纯化

Fig. 3 ELISA titers and purification of the mAbs. (A) The culture supernatant titers of mAbs 3B11, 3D07, 3A10 and 3B12. (B) Reduced SDS-PAGE showing purification of mAbs 3B11 and 3A10. 1: control IgG; 2: 3B11; 3: 3A10; M: molecular weight mass standards (kDa). The two bands correspond to the H chain and L chain of IgG, respectively.

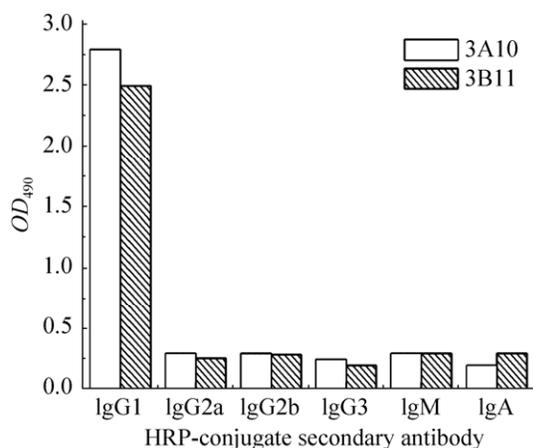


图 4 单抗 3A10 和 3B11 的亚类鉴定

Fig. 4 Subtype identification of mAb 3A10 and 3B11.

### 2.3 双抗夹心检测 IL-35 方法的建立

以抗 IL-27EBI3 的单抗 3B11 作为包被抗体，捕获样品中的 IL-35，以生物素化的抗 IL-12p35 单抗 3A10 作为检测抗体，用 Streptavidin-HRP 及其底物 TMB 作为显色手段，建立双抗夹心检测 IL-35 的方法。首先，我们确定了该检测方法中包被抗体 3B11 和生物素化抗体 3A10 的最佳用量，如图 5A 所示，用 3 种不同包被浓度的单抗 3B11 和 3 种不同浓度的生物素化单抗 3A10 进行组合，

对系列浓度的 IL-35 进行了夹心 ELISA 检测。以 IL-35 浓度为横坐标， $OD_{450}$  为纵坐标，曲线明显分为 3 个群，刚好代表了生物素化单抗 3A10 的工作浓度，工作浓度越高， $OD_{450}$  越大，其对  $OD_{450}$  值的影响远远大于单抗 3B11 的包被浓度。以  $OD_{450}$  值  $\geq 0.2$  为阳性 cutoff 值，图中曲线与直线  $OD_{450}$  为 0.2 交点所对应的 X 轴的数据即为相应条件下 IL-35 的最低检测浓度，可见生物素化单抗 3A10 的工作浓度为 500 ng/mL 时 IL-35 的检测灵敏度最高。而在同一生物素化单抗 3A10 用量的条件下，单抗 3B11 的包被浓度 10  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$  及 1  $\mu\text{g/mL}$  检测的敏感性差异不大，说明单抗 3B11 包被浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$  已足够。以确定的最佳抗体使用浓度建立标准的夹心 ELISA，并对序列浓度的重组 IL-35 进行检测。当 IL-35 浓度在 200  $\text{pg/mL}$  浓度以下时，检测呈现出较好的线性，在 400  $\text{pg/mL}$  和 800  $\text{pg/mL}$  时测定值偏离线性，比理论线性值偏小，可能与 IL-35 在 200  $\text{pg/mL}$  时的结合达到饱和有关。选择 200  $\text{pg/mL}$  及其以下浓度与对应的  $OD_{450}$  值作图并进行线性回归，得到了回归曲线和线性方程 (图 5B)，该检测方法的线性范围在 1.56–200  $\text{pg/mL}$ 。

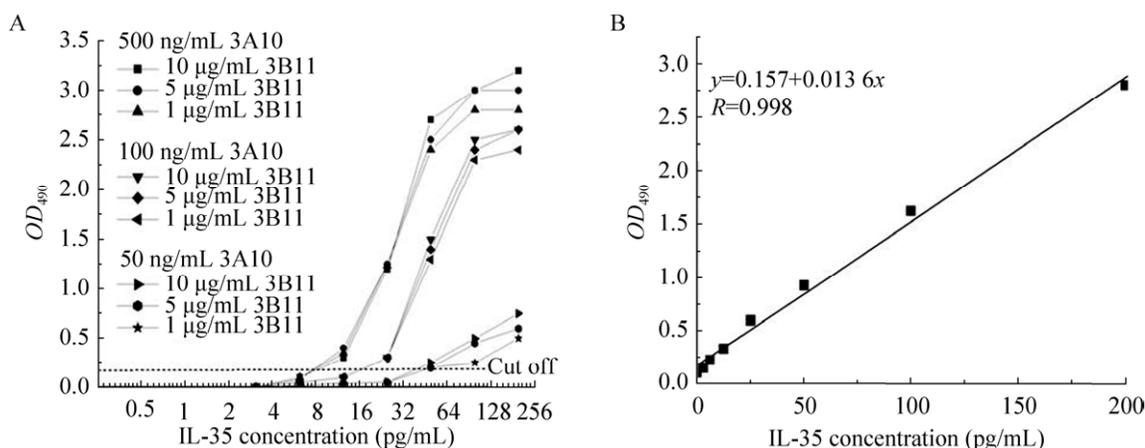


图 5 IL-35 ELISA 检测方法的建立

Fig. 5 Establishment of the sandwich ELISA assay for IL-35 detection. (A) Determination of the optimal usage of 3A10 and 3B11. (B) Linear regression of IL-35 concentrations and the corresponding  $OD_{450}$  values obtained by the established ELISA assay. Mean values from three independent experiments are showed by the line.

#### 2.4 双抗夹心检测 IL-35 方法的灵敏度、特异性、精密度和准确度

按照灵敏度的测定方法,我们测定了 20 个空白样品即样品稀释液的  $OD_{450}$  值,测定的平均值加上 2 倍标准差所得的值为 0.174,代入回归方程,计算出最低检测下限为 1.26 pg/mL。同时,以重组 1L-12p35、重组 IL-27EBI3、IL-12、IL-23、IL-27 以及 2 个非 IL-12 家族细胞因子 IL-6、IL-10 作为待检物对该检测方法的特异性进行了评定,结果表明该检测方法与 IL-12 家族成员 1L-12p35、IL-27EBI3、IL-12、IL-23、IL-27 的交叉反应率均为 0.1%,与 IL-6 和 IL-10 的交叉反应率为 0.1%。最后,我们对该检测方法的精密度(重复性)和准确度进行了评定,用该方法对高(200 pg/mL)、中(50 pg/mL)、低(5 pg/mL)浓度的 IL-35 进行分批多次检测,计算了测定的批内差和批间差,

结果见表 3,批内 RSD 为 5.1%–5.6%,批间 RSD 为 5.6%–7.2%,完全可以满足生物样品中 IL-35 的快速定量检测。用添加回收率作为准确性的评定指标,对终浓度为高(123.6 pg/mL)、中(43.6 pg/mL)、低(13.6 pg/mL)的 IL-35 添加品进行检测,计算出该检测方法的添加回收率(表 4)分别为 103%、90%及 92%。以上实验结果表明,该检测方法的各项指标都达到了定量分析的要求。

### 3 讨论

IL-35 是 IL-12 家族的一个新型细胞因子,由 Collison 等于 2007 年最先发现并确认<sup>[1]</sup>。IL-12 家族一共有 4 个成员,即 IL-12、IL-23、IL-27 和 IL-35。这 4 个细胞因子均为异质二聚体,均由一个螺旋束样细胞因子亚单位(p35、p19、p28)和一个可溶性细胞因子受体样亚单位(p40 和 EBI3)组成。

表 3 IL-35 定量 ELISA 检测方法的精密度

Table 3 Detection precision of the established ELISA assay for IL-35

Sample	Concentration (pg/mL)	Batch	Measured concentration (pg/mL) (n=5)	RSD (%)	
				Intra-batch	Inter-batch
Control materials	200	1	196±11	5.6	
		2	189±10	5.3	7.2
		3	193±10	5.2	
	50	1	48.5±2.5	5.2	
		2	47.7±2.6	5.4	6.5
		3	44.3±2.5	5.6	
	5	1	4.76±0.26	5.5	
		2	4.68±0.25	5.3	5.6
		3	4.80±0.24	5.1	

表 4 IL-35 定量 ELISA 检测方法的添加回收率(准确度)

Table 4 Recoveries of IL-35 from the samples fortified with different amounts of IL-35

Sample concentration (pg/mL)	Added concentration (pg/mL)	Final concentration (pg/mL)	Measured concentration (pg/mL)	Recovery concentration (pg/mL)	Recovery (%)
	10	13.6	14.0±0.7	10.4	104
3.6	40	43.6	39.6±2.0	36.0	90
	120	123.6	114.0±6.6	110.4	92

35、p19、p28 具有同源性,EBI3 和 p40 具有同源性,其中 p35 和 p40 组成 IL-12, p19 和 p40 组成 IL-23, p28 和 EBI3 组成 IL-27, p35 和 EBI3 组成 IL-35<sup>[3]</sup>。IL-12 家族成员的这种结构特征和同源性决定了它们在免疫检测上的复杂性,如果用完整的细胞因子进行免疫制备单克隆抗体,很有可能筛选到抗同一亚单位的两株抗体,而这一亚单位可能会在两种细胞因子同时存在(如 p40、EBI3),因而应用这两株单抗进行夹心 ELISA 检测时会出现两种细胞因子的交叉反应。为了降低出现交叉反应的可能性,我们采用了细胞因子亚单位分别进行免疫的策略,用基因工程方法,制备了 IL-35 两个亚单位 IL-27EBI3 和 IL-12p35 的重组蛋白,以重组蛋白作为免疫原,制备各自的单克隆抗体,再用抗 EBI3 和抗 p35 的单抗进行夹心 ELISA 检测 IL-35,这就在很大程度上避免了 IL-12 家族中其他成员的交叉反应。但是,我们还要考虑到 p35、p19、p28 之间的同源性和 p40、EBI3 之间的同源性,如 EBI3 与 p40 具有 27% 的氨基酸同源性,而且空间结构极为相似,两者具有相似的空间抗原表位,EBI3 刺激产生的抗体有可能与 p40 发生交叉反应。因而在本研究中,对用重组 EBI3 和 p35 作为抗原筛选出的单克隆抗体株还需作进一步的特异性鉴定,以确定其是否与 IL-12 家族的其他成员之间具有交叉反应。我们发现抗 EBI3 的单抗 3E10 与 IL-12 和 IL-23 都具有交叉反应,抗 p35 的单抗 3B09 与 IL-23 具有交叉反应,这种交叉反应的单抗在筛选的 3 株抗 p35 和 3 株抗 EBI3 单抗中各有 1 株,所占比率不小,但是否确实是与 p40 亚基或 p19 亚基发生交叉反应还有待进一步证实。利用鉴定出的特异性较好的单抗 3A10 和 3B11 建立的夹心 ELISA 与 IL-12 家族的另外 3 个成员 IL-12、IL-23、IL-27 的交叉反应率均为 0.1%,在检测上能有效地排除同家族

中其他 3 个细胞因子成员的干扰,说明用 IL-12 家族的其他细胞因子成员对制备单抗的特异性作进一步鉴定显得尤为重要,是筛选出特异性检测抗体的关键。本研究制备 IL-12 家族细胞因子的特异性检测抗体的思路和方法可为其他家族细胞因子检测抗体的制备提供一定的借鉴和参考。

IL-35 结构上与其他 IL-12 家族成员相似,但其表达和分泌方式却不同,小鼠 IL-35 组成型表达于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg,而人类 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 却不能组成型表达 IL-35,其表达需要炎症信号的刺激<sup>[4,24]</sup>。不仅如此,人类胸腺、淋巴结、扁桃体及外周血来源的 T 细胞亚群,包括效应性 T 细胞,幼稚或记忆 CD4<sup>+</sup> T 细胞及  $\gamma\delta$ T 细胞均不组成型表达 IL-35<sup>[25]</sup>。IL-35 的这种表达方式给其两个亚基 p35 和 EBI3 的基因克隆带来了困难。最近 Li 等<sup>[25]</sup>的研究表明,IL-35 除了表达于炎症信号刺激的 T 细胞系外,还可表达于炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ ) 刺激的血管内皮细胞、主动脉平滑肌细胞及单核细胞等非 T 细胞系。本研究中,在体外培养了人脐静脉内皮细胞 (HUEVC),用 TNF- $\alpha$  进行刺激,利用 RT-PCR 成功克隆了 IL-35 两个亚基 p35 和 EBI3 的编码基因,为后续 p35 和 EBI3 的重组蛋白和单抗的制备提供了有力保障。HUEVCs 可通过胰酶灌注新生儿脐带制备单细胞悬液而获得,来源较为丰富,容易获得。其次,HUEVCs 在体外容易进行原代培养,用 ECM 培养基常规培养就可以获得大量细胞。尽管目前还没有在炎症刺激的 HUEVCs 细胞中克隆 IL-35 编码基因的报道,但 HUEVCs 的获得和培养比 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 的获得和培养更为容易。我们认为,炎症因子刺激的 HUEVCs 可作为 IL-35 编码基因来源的一个重要模式细胞。

目前,国内还没有自主研发的 IL-35 检测试

剂盒, 主要依赖于进口。鉴于 IL-35 生物学功能以及其与多种疾病的相互关系还有待进一步的深入研究, 研发其检测试剂盒显得尤为重要。我们用单抗杂交瘤技术制备了 IL-35 的单克隆抗体, 建立了双抗夹心的 ELISA 检测方法, 该方法的灵敏度、特异性、精密度和准确度都达到了定量分析的要求, 为组装成 IL-35 ELISA 检测试剂盒打下了坚实的基础。我们将进一步寻求维持该检测方法中涉及到的各种试剂和蛋白的稳定性及有效保存方法, 并在临床和科研标本中进行大批量的预试和性能评定, 力争组装成具有自主知识产权的 IL-35 检测试剂盒。该方法不仅操作简便, 检测成本低, 而且可较短时间内完成 IL-35 的定量分析, 值得在高校、科研院所和医疗单位推荐使用。

## REFERENCES

- [1] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007, 450(7169): 566–569.
- [2] Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*, 2010, 11(12): 1093–1101.
- [3] Collison LW, Vignali DAA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev*, 2008, 226(1): 248–262.
- [4] Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, et al. Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol*, 2011, 186(12): 6661–6666.
- [5] Teymouri M, Pirro M, Fallarino F, et al. IL-35, a hallmark of immune-regulation in cancer progression, chronic infections and inflammatory diseases. *Int J Cancer*, 2018, 143(9): 2105–2115.
- [6] Xue WH, Yan D, Kan QC. Interleukin-35 as an emerging player in tumor microenvironment. *J Cancer*, 2019, 10(9): 2074–2082.
- [7] Su LC, Liu XY, Huang AF, et al. Emerging role of IL-35 in inflammatory autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(7): 665–673.
- [8] Vieyra-Lobato MR, Vela-Ojeda J, Montiel-Cervantes L, et al. Description of CD8<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes and their specific intervention in graft-versus-host and infectious diseases, autoimmunity, and cancer. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 3758713.
- [9] Branchett WJ, Lloyd CM. Regulatory cytokine function in the respiratory tract. *Mucosal Immunol*, 2019, 12(3): 589–600.
- [10] Wang ZH, Liu JQ, Liu ZZ, et al. Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis. *J Immunol*, 2013, 190(5): 2415–2423.
- [11] Niedbala W, Wei XQ, Cai BL, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*, 2007, 37(11): 3021–3029.
- [12] Kochetkova I, Golden S, Holderness K, et al. IL-35 stimulation of CD39<sup>+</sup> regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. *J Immunol*, 2010, 184(12): 7144–7153.
- [13] Nishino R, Takano A, Oshita H, et al. Identification of Epstein-Barr virus-induced gene 3 as a novel serum and tissue biomarker and a therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(19): 6272–6286.
- [14] Zeng JC, Zhang Z, Li TY, et al. Assessing the role of IL-35 in colorectal cancer progression and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(9): 1806–1816.
- [15] Gu XB, Tian T, Zhang B, et al. Elevated plasma interleukin-35 levels predict poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2651–2656.

- [16] Zhang YQ, Sun H, Wu H, et al. Interleukin 35 is an independent prognostic factor and a therapeutic target for nasopharyngeal carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015, 19(2): 120–124.
- [17] Liang YF, Chen QQ, Du WJ, et al. Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) blocking leads to induce antitumor cytotoxic T lymphocyte response and suppress tumor growth in colorectal cancer by bidirectional reciprocal-regulation STAT3 signaling pathway. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 3214105.
- [18] Jin P, Ren H, Sun W, et al. Circulating IL-35 in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Hum Immunol*, 2014, 75(1): 29–33.
- [19] Ning XW, Jian ZJ, Wang W. Low serum levels of interleukin 35 in patients with rheumatoid arthritis. *Tohoku J Exp Med*, 2015, 237(2): 77–82.
- [20] Boissier MC, Assier E, Biton J, et al. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2009, 76(1): 10–14.
- [21] Cheng ST, Yuan D, Liu Y, et al. Interleukin-35 level is reduced in patients with chronic Hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci*, 2018, 15(2): 188–194.
- [22] Tsuda M, Zhang WC, Yang GX, et al. Deletion of interleukin(IL)-12p35 induces liver fibrosis in dominant-negative TGF- $\beta$  receptor type II mice. *Hepatology*, 2013, 57(2): 806–816.
- [23] Sharafi SM, Shirzad H, Khanahmad H, et al. Monoclonal antibodies production against a 40 kDa band of hydatid cyst fluid. *Recent Pat Biotechnol*, 2018, 12(1): 57–64.
- [24] Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, et al. Human CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol*, 2008, 181(10): 6898–6905.
- [25] Li XY, Mai JT, Virtue A, et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine—a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33628.

(本文责编 陈宏宇)