

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000656

甲状腺髓样癌人源噬菌体单链抗体的筛选及初步鉴定

刘 琼, 庞 华, 奚级梅, 李文波, 许 璐

(重庆医科大学附属第一医院核医学科, 重庆 400016)

【摘要】目的:从大容量甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)人源噬菌体单链抗体(single chain variable fragments, scFv)库中筛选出特异的抗 MTC 单链抗体, 并对其生物学特性进行鉴定。**方法:**分别以甲状腺上皮细胞 TEC 细胞株和 MTC 细胞 TT 细胞株为抗原进行 5 轮“吸附-洗脱-扩增”的富集循环, 筛选出抗 MTC 抗体, 将筛选出的阳性克隆感染 *E.coli* HB2151; 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导抗体可溶性表达, HiTrap™ Anti E-tag 柱纯化表达抗体; SDS-PAGE 和 Western blot 检测抗体表达和相对分子质量; ELISA 检测可溶性 scFv 的特异性和免疫活性, 分为 TT 细胞组、SW480 细胞组、TEC 细胞组和 PBS 空白对照组, 分别检测各组在酶标仪 A_{450 nm} 处的吸光度; 四甲基偶氮唑盐比色分析法(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)分别检测 TT 细胞组、SW 480 细胞组与不同浓度 scFv 反应并读取 A_{490 nm} 处的吸光度, 设置空白对照 PBS 组, 分别计算细胞抑制率。**结果:**5 轮筛选后, 抗体得到了明显富集。随机挑取单个细菌克隆, phage ELISA 和 scFv ELISA 阳性率分别为 65% 和 50%。SDS-PAGE、Western blot 结果显示 MTC 特异性抗体分子量为 28 kD 左右。ELISA 结果显示, TT 细胞组的吸光度(0.41 ± 0.12)较 SW 480 细胞组(0.20 ± 0.03)、TEC 细胞组(0.13 ± 0.01)、PBS 空白对照组(0.07 ± 0.01)明显增加($P=0.000$)。MTT 法结果显示, TT 细胞组和 SW 480 细胞组在 scFv 浓度为 0.1、1、10 μmol/L 时, 2 细胞株间抑制率有统计学意义, 统计量分别是 $t=2.881, P=0.02; t=5.073, P=0.006; t=7.324, P=0.000$, 且在 scFv 浓度为 10 μmol/L 时, 对 TT 细胞的抑制率最高(0.59 ± 0.15)%。**结论:**利用噬菌体抗体库技术成功获得了特异性的抗 MTC 人源单链抗体。

【关键词】噬菌体抗体库; 人源单链抗体; 甲状腺髓样癌; 筛选**【中图分类号】**R392.11; R446.62; R736.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-01-07

Screening and preliminary identification of human single chain variable fragments antibodies against medullary thyroid cancer

Liu Qiong, Pang Hua, Xi Jimei, Li Wenbo, Xu Lu

(Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To isolate single chain variable fragments(scFv) antibodies against medullary thyroid carcinoma(MTC) from a large human phage display library and to identify the biological activity of positive clones. **Methods:** Thyroid epithelial cell line(TEC cell) and MTC cell line(TT cell) were used as negative and positive antigen respectively and then five rounds of ‘adsorption elution-amplification’ from the large human phage display library against MTC was conducted. Specific antibody was tested by ELISA. *E.coli* HB2151 was infected to induce the expression of soluble scFv. Soluble scFv was purified by HiTrap™ Anti E-tag column. The expression and relative molecular weight of the soluble scFv were detected by SDS-PAGE and Western blot. Immune activity of specific soluble scFv was detected by cell ELISA. They were divided into four groups: TT cells group, SW 480 cells group, TEC cells group and control group with PBS; A_{450 nm} was detected by microplate reader respectively. The effects of proliferation of TT cell at different concentrations were explored by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. They were divided into: TT cells group, SW 480 cells group and control group with PBS, A_{490 nm} absorbance was detected by microplate reader and inhibition rates were calculated. **Results:** After five panning, antibodies obtained obvious enrichment. Phage ELISA and scFv ELISA results showed that positive reactions to TT cells were 65% and 50% respectively. SDS-PAGE and Western blot showed that the relative molecular weight of the soluble scFv was about

28 kD. Cell ELISA results showed that the absorbance of TT cell group(0.41 ± 0.12) was significantly increased compared with that of SW 480 cells group(0.20 ± 0.03), TEC cell group(0.13 ± 0.01), PBS control group(0.07 ± 0.01) ($P=0.000$). MTT assay showed that when the concentration of scFv was 0.1, 1, 10 μmol/L, the inhibition rate between the two cell lines was statis-

作者介绍: 刘 琼, Email: 395341753@qq.com,

研究方向: 肿瘤核医学。

通信作者: 庞 华, Email: ph1973@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81071171)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150522.2255.003.html>

(2015-05-22)

tically significant different ($t=2.881, P=0.02; t=5.073, P=0.006; t=7.324, P=0.000$). When the concentration of scFv was 10 $\mu\text{mol/L}$, the inhibition rate of TT cells reached maximum (0.59 ± 0.15)%. **Conclusion:** Human anti-MTC is successfully obtained with large phage antiBAY library technique.

[Key words] phage antiBAY library; human single chain variable fragment; medullary thyroid cancer; screening

甲状腺髓样癌 (medullary thyroid carcinoma, MTC) 是一种起源于甲状腺滤泡旁细胞的神经内分泌恶性肿瘤^[1]。MTC 占有甲状腺癌的 3%, 但死亡率却占有甲状腺癌死亡率的 14%^[2]。MTC 的诊断缺乏特异性, 目前主要依靠血清降钙素水平测定和术后病检来确诊。治疗上, 手术切除肿瘤组织是主要方法, 但是对晚期和有远处转移的患者治疗效果欠佳。目前还没有数据证明化疗及核素治疗对 MTC 患者的治愈有积极作用^[3]。利用单克隆抗体或者自杀基因等生物疗法对晚期 MTC 患者进行治疗目前已经进入了临床前或临床试验阶段^[4-6]。应用杂交瘤技术制备的单克隆抗体具有鼠源性, 且制备过程复杂。而噬菌体抗体库技术制备的单链抗体 (single chain variable fragments, scFv) 克服了以上缺点, 具有完全人源, 易于筛选, 大量制备的优点。本研究拟利用噬菌体抗体库技术筛选出抗 MTC 人源单链抗体, 对生物学特性进行鉴定, 以期对 MTC 的诊断和治疗提供一定的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

大容量抗 MTC 人源噬菌体单链抗体库本课题组已经成功制备^[7]。辅助噬菌体 M13K07、菌株 *E.coli* TG 1、*E.coli* HB 2151, 均购自 New England Biolabs 公司。HRP 标记抗 M13K07 单克隆抗体 (HRP/Anti-M13K07 Monoclonal Antibody) 和 HRP 标记的 Anti-E tag 单克隆抗体 (HRP/Anti E-tag Monoclonal Antibody) 购自 Abcam 公司, HRP 标记的抗鼠抗体购自北京中山金桥生物科技有限公司。人 MTC 细胞株 TT 细胞、甲状腺上皮细胞株 TEC 细胞株购自上海众华生物科技有限公司, 结肠癌细胞株 SW 480 购自中科院上海细胞库。噻唑蓝 (thiazolyl blue, MTT)、胎牛血清、细胞培养基、细菌培养基购自 Gibco/BRL 公司。HiTrap™ Anti E-tag 柱购自 GE 公司, 辣根过氧化物酶 TMB 显色剂购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体抗体的表达 取噬菌体抗体库 1 ml (具体方法见参考文献 7), 加入 2×YT-G 培养基中, 37 °C 震荡培养 1 h 后加入 M13K07 辅助噬菌体, 轻柔震荡 1 h, 1 000 × g 离心 10 min, 弃上清; 2×YT-AK 悬浮细菌沉淀, 37 °C 震荡培养过

夜; 取过夜培养菌液, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 取上清; 向上清中按 1/5 体积的量加入冰预冷的 PEG/NaCl, 冰浴 45 min; 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, PBS 重悬沉淀; 4 °C、1 000 × g 离心 10 min, 取上清即为噬菌体抗体库溶液。0.45 μm 过滤器过滤, 4 °C 保存。

1.2.2 甲状腺髓样癌细胞对抗体库的筛选富集 收集对数生长期的 TEC 细胞与新鲜制备的噬菌体抗体库液在 4 °C 孵育 4 h, 3 000 × g 离心 20 min, 收集上清。此为经阴性筛选后的抗体库。收集对数生长期的 TT 细胞, PBS (pH=7.2) 重悬细胞, 加入免疫包被管, 室温包被过夜。次日向免疫包被管中加入 MPBS (含 2% 脱脂乳的 PBS) 至满孔; 37 °C 封闭 2 h; 弃上清, PBS 洗管 3 遍。向封闭好的 TT 细胞加入阴性筛选后的抗体库液轻摇孵育 30 min 后静置 1.5 h, 弃上清。PBST 洗涤 3 次, PBS 洗涤 3 次, 拍干。加入 0.2 mol 甘氨酸-HCl (pH=2.5), 37 °C 轻柔洗脱 6 min, 立即加入 2 ml Tris-HCl (pH=7.4) 中和洗脱液; 加入对数生长期的 *E.coli* TG1; 37 °C、150 r/min 震荡 1 h; 加入 2×YT-AG (含 4×10¹⁰ pfu 的辅助噬菌体 M13K07), 37 °C 轻柔震荡 1 h; 1 000 × g 离心 10 min, 弃上清。2×YT-AK 重悬细菌沉淀; 37 °C、220 r/min 震荡培养过夜。过夜菌液 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 即为第 1 次筛选所得抗体库, 至此完成了第一轮淘筛。如此进行 5 轮淘筛。每次筛选前后的抗体库液均需感染 *E.coli* TG1 后涂 SOBAG 琼脂板计算抗体库滴度, 作为特异性噬菌体抗体富集指标。

1.2.3 Phage ELISA 和 scFv ELISA 初步检测抗原阳性重组抗体 将第 5 轮淘筛所得 SOBAG 琼脂板随机挑取单个菌落, 分别接种至含有 2×YT-AG (200 μl /孔) 的 96 孔板, 标记为 P0 板, 过夜培养。过夜培养菌液的每个细菌克隆均分别制备噬菌体抗体库液和诱导表达可溶蛋白, 噬菌体抗体库液和可溶蛋白作为一抗分别加入 2 个包被好的酶标板中, 阴性对照组加入等量的 PBS, 分别以 HRP/Anti-M13 单克隆抗体和 HRP/Anti-E tag 为二抗反应 (37 °C、1 h); TMB 显色 45 min; 酶标仪 A_{450 nm} 处读数。实验组 A 值大于阴性对照组 2 倍作为阳性。

1.2.4 可溶性重组抗体的生产 根据 scFv ELISA 阳性结果取噬菌体液感染 *E.coli* HB 2151, 划线涂布 SOBAG-N 平板, 培养液培养至对数生长期时加入终浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的异丙基- β -D 硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG), 分别在剧烈震荡 4、6 h 时, 离心收集细菌。将细菌重悬于 PBS 缓冲液后液氮速冻 30 min 后 37 °C 解冻, 如此反复冻融 3 次后超声碎菌。所得菌液离心收集上清表达可溶性 scFv。

1.2.5 SDS-PAGE、Western blot 鉴定可溶性 scFv 的表达 分别将未经 IPTG 诱导的 *E.coli* HB 2151、诱导表达 4、6 h 和纯化可溶性 scFv 加入上样缓冲液中进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色凝胶。将 SDS-PAGE 鉴定表达的可溶性 scFv 经 Hi-Trap™ Anti-E tag 亲和层析柱纯化。纯化后的蛋白行 Western blot 检测,HRP-鼠抗 E-tag 单克隆抗体为一抗、HRP-抗鼠抗体为二抗,化学发光,显影,定影。

1.2.6 细胞 ELISA 检测可溶性抗体的免疫活性 将 TT 细胞和 SW 480 细胞、TEC 细胞分别培养于 96 孔板,孵箱培养 48 h,PBS 洗 3 次,孵箱干燥 10 min,0.25 % 的戊二醛固定 10 min,封闭液封闭 1 h,PBST 和 PBS 各洗 3 次,加上经纯化的可溶性 scFv,以 HRP/Anti-E tag 为二抗孵育,TMB 显色 45 min,酶标仪 450 nm 波长处测定各孔的 A 值,并于光镜下细胞拍照。PBS 替代纯化 scFv 作为 TT 细胞组空白对照。

1.2.7 细胞增殖抑制检测 将 TT 细胞和 SW 480 细胞按 4×10^3 个/孔种植于 96 孔板上,次日换液后加入培养基梯度稀释的单链抗体溶液,浓度分别为 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10 $\mu\text{mol/L}$,各 50 μl /孔,对照组加入 PBS 缓冲液,每组均设置 5 个重复孔。细胞孵箱孵育 48 h 后,加入 MTT 溶液 20 μl /孔,反应 4 h 终止反应后加入二甲亚砜 150 μl /孔,摇床低温震荡 10 min,酶标仪于吸光度为 $A_{490\text{ nm}}$ 处读数,并计算细胞抑制率。抑制率 $\% = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照组}} \times \%$ 。

1.3 统计学处理

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析软件分析处理,所得的数值均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐采用多重比较 Dunnett's T3 检验,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 对噬菌体抗体库的筛选富集

以 TT 细胞对抗体库进行了 5 轮“吸附-洗脱-扩增”,随着洗涤次数的增加,抗体库的收获率也增加,5 轮筛选后收获率增加了 145 倍,说明甲状腺髓样癌特异性抗体得到了明显富集(表 1)。

表 1 抗甲状腺髓样癌特异性抗体的富集

Tab.1 Enrichment of phage antibodies against MTC from the library

富集次数	投入噬菌体量 (cfu)	产出噬菌体量 (cfu)	噬菌体收获率
1	2.5×10^{11}	4.9×10^5	1.96×10^{-6}
2	2.3×10^{11}	6.3×10^5	2.74×10^{-6}
3	3.5×10^{11}	4.2×10^6	1.2×10^{-5}
4	2.9×10^{11}	5.2×10^6	1.79×10^{-5}
5	2.5×10^{11}	7.1×10^7	2.84×10^{-4}

2.2 Phage ELISA 和 scFv ELISA 检测可溶性抗原阳性重组抗体

Phage ELISA 检测,13 个克隆与 TT 细胞呈阳性反应,阳性率为 65%。ScFv ELISA 检测,10 个克隆与 TT 细胞呈阳性反应,阳性率为 50%。结果显示 scFv ELISA 阳性反应孔所对孔编号与 phage ELISA 检测中阳性反应孔中的编号基本一致,说明噬菌体感染的 *E.coli* TG 1 的同时蛋白也得到了初步的可溶性表达(图 1)。

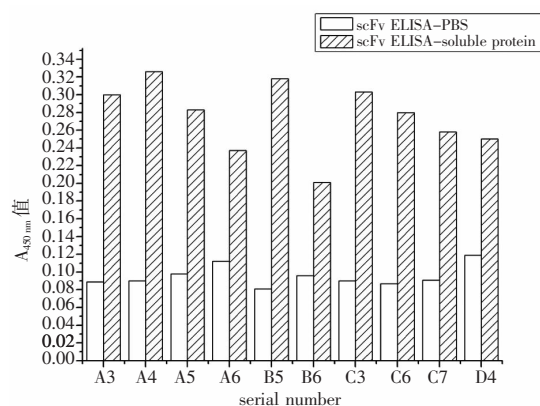
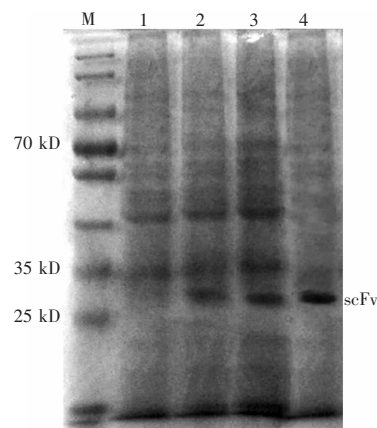


图 1 scFv ELISA 检测可溶性抗原阳性 scFv 与 TT 细胞结合活性
Fig.1 Analysis of the binding activities of the selected soluble scFv against TT cells

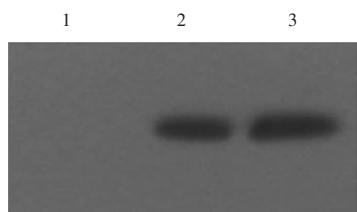
2.3 SDS-PAGE、Western blot 鉴定可溶性 scFv 的表达

分别取未经诱导 *E.coli* HB 2151 全菌体、诱导表达 4、6 h 和经纯化的可溶性 scFv 行 SDS-PAGE,结果显示抗体分子得到了可溶性表达(图 2)。取纯化的可溶 scFv 行 Western blot 检测,结果显示在相对分子量为 28 kD 左右处有清晰的显影条带,表明抗体得到了可溶性表达,诱导表达 6 h 后蛋白表达量未见明显增加(图 3)。



M. 标准分子量蛋白;1. 未经诱导的 *E.coli* HB 2151 全菌体;
2. scFv 诱导 4 h 的 scFv;3. scFv 诱导 6 h;4. 纯化 scFv

图 2 scFv 诱导表达及 SDS-PAGE 分析
Fig.2 SDS-PAGE analysis of the scFv expressed in *E.coli* HB 2151



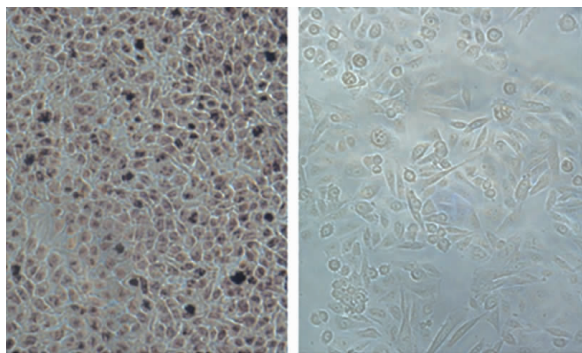
1. 未经诱导的 *E.coli* HB 2151 全菌体;
2. 诱导 4 h 纯化 scFv; 3. 诱导 6 h 纯化 scFv

图 3 Western blot 检测纯化抗体

Fig.3 Western blot detection of purified scFv

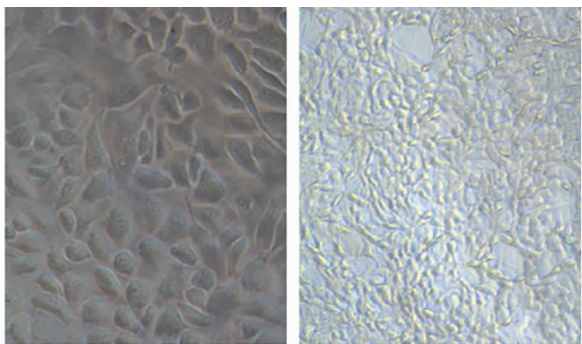
2.4 细胞 ELISA 检测可溶性抗体的特异性和免疫活性

细胞 ELISA 检测各组细胞在 $A_{450\text{nm}}$ 处的吸光度, 方差分析结果显示 TT 细胞组 (0.41 ± 0.12)、SW 480 细胞组 (0.20 ± 0.03)、TEC 细胞组 (0.13 ± 0.01)、PBS 空白对照组 (0.07 ± 0.01) 4 组之间的差异具有统计学意义 ($F=103.626, P=0.000$), 多重比较结果显示 TT 细胞; 力较其它组明显增加, 对 TT 细胞具有较高的特异性。光镜拍照结果显示 scFv 具有较高的免疫活性(图 4)。



A. 甲状腺髓样癌细胞
TT 细胞阳性

B. 结肠癌细胞 SW 480
细胞阴性



C. 甲状腺上皮细胞 TEC
细胞阴性

D. 甲状腺髓样癌阴性

图 4 纯化特异性抗体光镜下检查结果 (TMB, $200 \times$)

Fig.4 Specific test of purified antibody under microscope
(TMB, $200 \times$)

2.5 细胞增殖抑制检测

MTT 法比较不同浓度 scFv 作用下对 2 组细胞增殖影响

(表 2)。分析数据得: 随着药物浓度的增加, 细胞的抑制率也有增加的趋势 TT 细胞组和 SW 480 细胞组在 scFv 浓度为 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 相同 scFv 浓度作用下 2 组细胞株间抑制率有统计学意义 ($t=2.881, P=0.02; t=5.073, P=0.006; t=7.324, P=0.000$)。说明相同 scFv 浓度作用下对 2 细胞株的抑制率有差异, 其余各浓度下 2 细胞株间比较抑制率均无统计学差异, 且在浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 TT 细胞的抑制率最高 ($0.59 \pm 0.15\%$); TT 细胞组在不同 scFv 浓度作用下组间比较差异有统计学意义 ($F=4.767, P=0.004$), 对数据进行两两比较得知, 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 组与 1 $\mu\text{mol/L}$ 组之间, 无统计学差异 ($P=0.253$), 与其他浓度组比, 均有统计学差异 ($P<0.05$); SW 480 细胞组在不同 scFv 浓度作用下组间无统计学差异 ($F=1.666, P=0.181$)。

表 2 不同浓度的可溶性 scFv 对 TT 细胞和 TEC 细胞的生长抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

Fig.2 Difference concentrations of scfv on inhibition rate of TT cells and TEC cells ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	TT	SW 480	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
0.000 1	0.03 ± 0.32^a	-0.06 ± 0.17	0.562	0.589
0.001	0.11 ± 0.20^a	0.02 ± 0.07	0.964	0.362
0.01	0.28 ± 0.23^a	0.06 ± 0.13	1.992	0.080
0.1	0.31 ± 0.16^{ab}	0.10 ± 0.06^b	2.881	0.020
1	0.43 ± 0.17^{ab}	0.04 ± 0.03^b	5.073	0.006
10	0.59 ± 0.15^{ab}	0.08 ± 0.05^b	7.324	0.000

注: a, 细胞在不同浓度 scFv 作用下组内抑制率有统计学差异 ($P=0.004$); b, 相同 scFv 浓度下两细胞株间抑制率有统计学意义 ($P<0.05$)

3 讨论

目前的研究表明, RET 基因的突变是 95% 的遗传型和 70% 的散发型 MTC 分子学发病基础, 且 MTC 来源于甲状腺滤泡旁细胞, 降钙素和降钙素相关肽在肿瘤组织中高表达, 而其他组织中少有表达, 这使得 MTC 尤其适合生物靶向治疗^[8]。本实验利用噬菌体展示技术从大容量 MTC 人源单链抗体库中成功筛选出了 MTC 特异抗体, 并对筛选出的抗体其进行了生物学鉴定, 数据表明该抗体能够特异性结合 TT 细胞并抑制其增殖。

传统筛选一般通过纯化抗原来获得特异性抗体。但对于肿瘤细胞来说, 其表面抗原多种多样, 很多都不为人所知, 纯化存在一定困难。即使得到纯化抗原, 因肿瘤细胞抗原天然构象和抗原表位展示的复杂性, 抗原构象也难以模拟体内复杂环境^[9-10]。

目前国内外已有学者利用组织或全细胞进行淘筛,成功筛选到针对肿瘤抗原的高度特异抗体^[1]。考虑到筛选过程中抗体的非特异性结合,本实验在前人基础上对筛选策略进行了优化。作者先用正常的甲状腺上皮细胞进行负性扣除,再利用甲状腺髓样癌细胞进行 5 轮正性吸附,这样就大大提高了抗体的收获率。实验结果显示随着筛选次数的增加,抗体的收获率也随之增加,到第 5 轮时较第 1 轮有明显的富集。随后对抗体进行 phage ELISA 和 scFv ELISA 鉴定,结果均证明抗体阳性插入率和基因表达程度很高。可溶性 scFv 行 SDS-PAGE、Western blot 和免疫学活性的鉴定,均证实从大容量噬菌体抗体库中成功获得了抗 MTC 特异性人源单链抗体。

然而,本实验筛选策略也有很多的不足。首先必须保证库容量足够大(本实验前期工作中已成功制备库容为 3×10^5 的抗体库^[7]);其次筛选过程中封闭洗脱等过程还要不断地进行优化和改进;抗体孵育结合中如何控制好时间,以减少非特异性结合,从而提高阳性结合率;洗脱次数该如何科学的控制都是实验中需要探索的问题。抗体亲和力是抗原抗体反应中关注的 1 个重要指标,然而本实验是利用全细胞进行筛选,筛选出的抗体是针对何种抗原尚不清楚,故对抗体亲和力的测定也难以实现,这就需要进行进一步深入的探索研究。临床应用中有时需要快速高效的筛选出某中特异性抗体,但抗体筛选是个耗时的过程,这样抗体的应用就受到了限制。Yim 等^[12]构建了人源单链抗体库,将其在大肠杆菌胞质中进行表达,然后利用反复荧光分选术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)仅在 1 d 的时间内就筛选到了高特异性的单链抗体,此种方法对小容量抗体库也适用,这为今后的实验提供了思路。本实验接下来将对获得的可溶性抗体进行核素标记,建立荷瘤裸鼠模型后对其体内外放射免疫学显像研究,以期为 MTC 提供 1 种新的诊断和辅助治疗方法。

参 考 文 献

- [1] Kevin S, Amal A, Ngan L, et al. Hereditary medullary thyroid cancer: Age-Appropriate thyroidectomy improves disease-free survival[J]. *Annals of surgical oncology*, 2013, 20(5): 1451-1455.
- [2] David YG, Herbert C. Palliation of advanced thyroid malignancies[J]. *Surgical Oncology*, 2007, 16(4): 237-247.
- [3] Anton S, Monika S, Rubina Y, et al. Dendritic cell vaccination in medullary thyroid carcinoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(9): 2944 - 2953.
- [4] Minemura K, Takeda T, Minemura K, et al. Cell-specific induction of sensitivity to ganciclovir in medullary thyroid carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(5): 1814-1822.
- [5] Juweid ME, Hajjar G, Swayne LC, et al. Phase I/II trial of (131) IMN-14F(ab)2 anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody in the treatment of patients with metastatic medullary thyroid carcinoma[J]. *Cancer(Phila)*, 1999(85): 1828-1842.
- [6] Soler MN, Milhaud G, Lekmine F, et al. Treatment of medullary thyroid carcinoma by combined expression of suicide and interleukin-2 genes[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 1999, 48(2-3): 91-99.
- [7] 胡小丽, 王政杰, 庞 华. 人源甲状腺髓样癌噬菌体抗体库的构建及初步鉴定[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(9): 1040-1043.
- [8] 于 洋, 高 明. 甲状腺髓样癌研究进展[J]. *现代肿瘤学*, 2008, 16(7): 1242-1244.
- [9] Mariangela F, Laura, Delia M, et al. Panning phage antibody libraries on cells: isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection[J]. *Cancer Res*, 1998(58): 991-996.
- [10] Tara H, Nobor S, Kirk M, et al. Obligate multivalent recognition of cell surface tumor egulin following selection from a multivalent phage antibody library[J]. *J Biomol Screen*, 2006(11): 985-995.
- [11] Mikhail P, Christoph R, Carlos F. Barbas III, Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using phage display technology[J]. *Immunol MethAs*, 2004, 291(1-2): 137-151.
- [12] Sung SY, Hyun BB, Young HK, et al. Rapid Isolation of Antibody from a Synthetic Human Antibody Library by Repeated Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)[J]. *Plos One*, 2014, 9(10): 1-11.

(责任编辑: 关蕴良)