

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738(2012)09 - 0960 - 05

## Mucin 16 蛋白的表达纯化及单克隆抗体的制备与鉴定

杨 赟, 丁宇婷, 龚慧婷, 于占娇, 李晓彤\* (厦门大学生命科学学院, 杂交瘤和抗体技术中心, 福建 厦门 361005)

### Expression and purification of mucin 16 and preparation and characterization of anti-mucin 16 monoclonal antibody

YANG Yun, DING Yu-ting, GONG Hui-ting, YU Zhan-jiao, LI Xiao-tong\*

Hybridoma and Antibody Center, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**[Abstract]** **AIM:** To generate monoclonal antibodies (mAbs) against mucin 16 using purified recombinant protein of human mucin 16 N terminus with His tag (His-mucin 16N) as the antigen. **METHODS:** Mucin 16 N terminus was cloned into a prokaryotic expression vector pET-32. His-mucin 16N was then expressed in *E. coli* and purified by the affinity chromatography. Cell fusion was performed after the BALB/c mice were immunized with the purified His-mucin 16N protein. We screened hybridoma cell strains producing mAbs against mucin 16. The specificity and titer of the antibodies were characterized with ELISA, Western blotting, immunofluorescent and immunohistochemical staining. **RESULTS:** The recombinant protein of His-mucin 16N was expressed and purified. A few hybridoma cell strains which could secrete specific mAbs against mucin 16 were obtained, and one anti-mucin 16 mAb with good specificity and high titer was selected and purified. The isotype of this anti-mucin 16 mAb was determined as IgG1, which indicated that this anti-mucin 16 mAb could be used for ELISA, Western blotting, immunofluorescent and immunohistochemical staining. The endogenous expression of mucin 16 in various cancer cell lines or tissues was also examined with this anti-mucin 16 antibody by Western blotting and other immunoassays. **CONCLUSION:** The recombinant protein of His-mucin 16N was expressed and purified successfully, with which we prepared anti-mucin 16 mAb with good specificity and high titer.

收稿日期: 2012 - 05 - 22; 接受日期: 2012 - 07 - 01

基金项目: 福建省科技重点项目(2011Y0050); 厦门市科技计划创新项目(3502Z20123009)

作者简介: 杨 赟(1988 -), 男, 河南濮阳人, 硕士生

Tel: 0592-2188250; E-mail: jamesyangunl@126.com

\* Corresponding author, E-mail: xtl@xmu.edu.cn

**[Keywords]** mucin 16; CA125; protein purification; monoclonal antibody; hybridoma

**[摘要]** 目的: 在原核生物中表达带有 His 标签的 mucin 16 N 端重组蛋白(简称为 His-mucin 16N), 制备抗 mucin 16 的单克隆抗体(mAb)。方法: 将 mucin 16 基因片段插入原核表达载体 pET-32, 在大肠杆菌中表达重组蛋白, 用亲和纯化方法纯化后免疫 BALB/c 小鼠, 并进行细胞融合。筛选可稳定分泌抗 mucin 16 抗体的阳性单克隆杂交瘤细胞株, 用 Western blot、ELISA、免疫荧光和免疫组化等方法分析和鉴定抗 mucin 16 的 mAb。结果: 表达并纯化了 His-mucin 16N 蛋白; 筛选出几株可稳定分泌特异性抗人 mucin 16 mAb 的细胞株; 挑选出效价高、特异性好的 1 株进行纯化。获得的抗 mucin 16 mAb, 可用于 Western blot、ELISA、免疫组化、免疫荧光等检测, 并鉴定该抗体亚型为 IgG1。通过上述免疫学实验, 分析了在不同肿瘤细胞中 mucin 16 的表达情况。结论: 在原核生物中成功表达和纯化带 His 标签的 mucin 16N 重组蛋白, 制备出具有高特异性的抗 mucin 16 的 mAb。

**[关键词]** mucin 16; CA125; 蛋白纯化; 单克隆抗体; 杂交瘤  
**[中图分类号]** R392.11, Q813.2 **[文献标识码]** B

黏蛋白 16(mucin 16) 是一种高度糖基化的跨膜黏蛋白, 属于黏蛋白家族(mucin family) 的成员之一。Mucin 16 基因定位于染色体 19p13.2, 由大约 179 kb 的基因组 DNA 编码。正常情况下, 存在于视网膜上皮, 上呼吸道上皮以及胸腔、腹腔、盆腔间皮细胞, 输卵管上皮以及子宫内膜中, 可以保护这些器官外表面<sup>[1]</sup>。但是在卵巢癌、乳腺癌等许多癌细胞中过度表达<sup>[2]</sup>, 其胞外部分被称作 CA125, 即糖类抗原 125, 可以被剪切释放到胞外基质或血清中。它是卵巢癌, 乳腺癌, 肺癌等的重要临床诊断肿瘤标志物之一<sup>[3-5]</sup>。由于 mucin 16 是一个大分子糖蛋白, 研究难度较大, 所以人们对它的生物学功能及其如何参与肿瘤的发生、形成和转移的调控机制了解非常有限。虽然近年来的一些研究表明, mucin 16 的过表达会保护癌细胞免于 NK 细胞的杀伤<sup>[6]</sup>, 可能可以增强癌细胞的迁移能力<sup>[7-9]</sup>。还有研究报道, mucin 16 可和  $\beta$ -catenin 以及 E-cadherin 相互作用, 参与上皮细胞向间质细胞的转变(EMT), 形成了肌动蛋白细胞骨架的改变<sup>[10]</sup>, 促使癌症转移。为深入研究 mucin 16 的生物学功能及其在肿瘤形成和转移中的调控作用, 本实验室构建了 mucin 16 的原核表达载体

并表达和纯化带有 His 标签的 mucin 16 重组蛋白, 以其为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 通过传统杂交瘤技术筛选抗 mucin 16 的单克隆抗体 (mAb)。通过一系列的鉴定和分析, 终于获得了可以识别肿瘤细胞内源 mucin16 蛋白的抗体。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 所用大肠埃希氏菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 为厦门大学杂交瘤抗体中心保存。人乳腺癌细胞系 SKBR-3、ZR-7530、MDA-MB-231、MCF-7; 人肺癌细胞系 Spca-1、H460; 白血病细胞 MT-4; 淋巴瘤细胞 U937; 人成骨肉瘤细胞 SaoS2; 小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 等为本中心保存细胞株。His 标签表达载体 pET-32 为本中心保存。敲低 mucin 16 表达水平的质粒为本实验室构建。BALB/c 小鼠购自厦门大学医学院实验动物中心 (SPF 级); RPMI1640 培养基, DMEM 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品; HT、HAT、PEG 1450 都为 Sigma 公司产品。镍离子亲和树脂为 GE 公司产品; 弗氏完全佐剂和不完全佐剂为 Sigma 公司产品。PVDF 膜为 Millipore 公司产品。ECL 反应液为北京普利莱公司产品。蛋白 G 亲和层析柱为 GE 公司产品。鼠 mAb 亚型检测试剂盒为 Sigma 公司产品。免疫组化检测试剂盒为福州迈新公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 带有 His 标签 mucin 16N 重组蛋白的诱导表达** 将测序正确的带有 His 标签的 mucin 16 N 端的重组蛋白基因片段的质粒转入大肠杆菌中, 于 37 $^{\circ}$ C 摇菌, 待 600 nm 吸光度 ( $A_{600}$ ) 值达 0.6 左右时, 加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 20 $^{\circ}$ C 诱导 18 h。同时设置不加 IPTG 的样品作为对照组。收菌后在菌体沉淀中加入 200  $\mu$ L 的 1 $\times$  Ni-NTA 结合缓冲液和 1  $\mu$ L 的 1 g/L PMSF, 震荡重悬。超声破碎至菌液澄清。4 $^{\circ}$ C 高速离心后将上清转移至新的离心管中, 沉淀中加入 SDS, 沸水加热变性, 作为沉淀组; 向其余的上清中加 7~10  $\mu$ L 镍离子亲和树脂, 置于垂直混合仪上吸附 30 min。低速离心吸去上清, 加入 500  $\mu$ L 1 $\times$  Ni-NTA 洗涤缓冲液, 洗涤亲和树脂 3 次, 加入 SDS, 混匀后煮沸变性, 作为亲和树脂吸附组。观察 mucin 16 的表达量以及可溶性表达情况。

**1.2.2 His-mucin 16N 重组蛋白的纯化** 将携带 His-mucin 16 重组蛋白基因片段的大肠杆菌培养液进行蛋白诱导, 诱导结束后 4 $^{\circ}$ C, 4 200 r/min 离心 25 min, 弃上清。在沉淀菌体中加入 1 $\times$  Ni-NTA 结合缓冲液超声破碎直至菌液澄清。离心取上清转加入镍离子亲和树脂, 4 $^{\circ}$ C 下吸附 45 min。吸附结束, 用 1 $\times$  Ni-NTA 洗涤缓冲液洗镍离子亲和树脂, 然后在亲和树脂中加入适量 1 $\times$  Ni-NTA 洗脱缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 下置于垂直混合仪混匀洗脱蛋白, 将洗脱液浓缩, 置换成 PBS 缓冲液后 SDS-PAGE 分析纯度。

**1.2.3 动物免疫及阳性杂交瘤细胞株筛选** 初次免疫时, 将纯化的 His-mucin 16N 与等体积完全弗氏佐剂充分混匀形成油包水状, 按 100  $\mu$ g/只皮下注射 BALB/c 小鼠。3 周后将蛋白与不完全弗氏佐剂等体积混匀乳化, 按 50  $\mu$ g/只小鼠背部多点注射。以后每隔 2 周免疫 1 次, 细胞融合前 3 d 腹腔注

射抗原加强免疫。取小鼠脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合, 两周后用 ELISA 方法筛选可识别 mucin16 N 端蛋白的杂交瘤细胞株, 采用有限稀释法对鉴定出的阳性克隆细胞进行 2~3 次亚克隆, 直至获得可稳定分泌抗 mucin 16 的 mAb。

**1.2.4 诱导产生腹水及抗体纯化** 在预先 1 周注射液体石蜡致敏的 BALB/c 小鼠腹腔接种已建株的杂交瘤细胞约  $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  个, 7 d 后采集腹水离心, 用蛋白 G 亲和层析柱纯化, 收集蛋白峰 SDS-PAGE 电泳分析, 抗体的 IgG 亚型的鉴定按 Sigma 检测试剂盒说明书操作。

**1.2.5 抗体效价及特异性测定** 抗体效价测定采用间接 ELISA 法, 先用 His-mucin16 融合蛋白包被酶标板; 将纯化的抗体从 1 mg/mL 用 PBS 二倍梯度稀释, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TMB 显色, 4 mol/L 浓硫酸终止反应, 测  $A_{450}$  值。阴性对照为小鼠天然 IgG。以 P/N (即阳性比阴性) 的值大于 2.1 的抗体最大稀释度作为抗体的效价。抗体的特异性除了用 ELISA 实验测定对 mucin 16 融合蛋白的结合外, 还用 Western blot 法测定。我们构建了可敲低 mucin 16 的 ShRNA 载体来敲低 mucin 16 阳性细胞中内源 mucin 16 的表达量, 再用自制的抗 mucin 16 mAb 进行 Western blot 分析。验证抗体是否可特异性地识别细胞内源性的 mucin 16。Western blot 步骤: 收集细胞, 将细胞裂解后制样, SDS-PAGE 电泳后转膜。50 g/L 的脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次; 加入制备的抗 mucin 16 的 mAb (1:2 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜。加入山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h; 加入 ECL 底物, 显影。

**1.2.6 Western blot 分析** 收集乳腺癌细胞 (ZR-7530、MDA-MB-231、MCF-7), 肺癌细胞 (Spca-1、H460), 骨髓瘤细胞 (Sp2/0), 淋巴瘤细胞 (U937) 和白血病细胞 (MT-4), 裂解细胞, SDS-PAGE 后按上述 Western blot 的步骤用自制抗 mucin 16 的 mAb 分析不同细胞中 mucin 16 的表达情况。

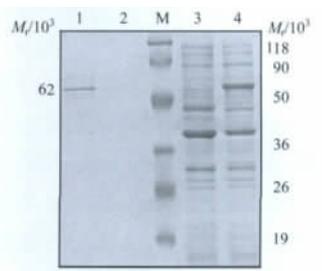
**1.2.7 免疫荧光染色** 对乳腺癌细胞 (SKBR-3) 和肺癌细胞 (Spca-1 和 H460) 用制备的抗 mucin 16 mAb 做免疫荧光分析 mucin 16 的表达情况。步骤如下: 取出长有细胞的盖玻片, 弃培养液, 用 PBS 洗 2 次, 加入 40 g/L 多聚甲醛, 室温固定 10 min, PBS 洗涤后, 加入 1 mL 100 g/L BSA/PBS, 室温封闭 1 h。使用 100 g/L BSA/PBS 稀释抗 mucin 16 的 mAb, 室温孵育 3 h。使用 100 g/L BSA/PBS 稀释的四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG 室温避光孵育 1 h。PBS 洗 6 次。加入 1  $\mu$ g/mL 用 PBS 稀释的 DAPI, 孵育 2 min。用 PBS 洗 4 次, 避光, 自然风干。封片后观察。

**1.2.8 免疫组织化学染色** 用抗 mucin 16 的 mAb 对乳腺癌石蜡组织切片进行免疫组织化学染色分析。乳腺癌组织切片脱蜡、水化。PBS 洗 5 min。将切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0) 中, 92 $^{\circ}$ C~98 $^{\circ}$ C 水浴加热 15 min, 自然冷却, PBS 洗; 30 mL/L 过氧化氢温育 10 min; PBS 洗切片; 将试剂盒中的血清用 PBS 稀释, 滴加在组织上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。滴加抗 mucin 16 mAb (1:200), 4 $^{\circ}$ C 冰箱内放置过夜, 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中复温 1 h。PBS 洗 5 次; 滴加生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 洗 5 次; 加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 洗 5 次; 把配好的

AEC 显色液, 混匀后滴加至切片。室温下显色, 显微镜下控制反应时间。自来水终止反应, 苏木精衬染、脱水、透明、中性树胶封片。抽取 1 份用小鼠 IgG 代替一抗, 其余过程与上述程序相同, 所得染色片作为阴性对照。

## 2 结果

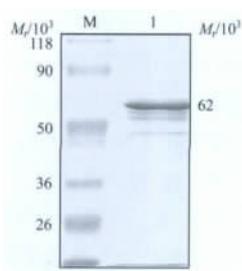
**2.1 His-mucin 16N 重组蛋白的诱导表达** 以带有 mucin 16 基因片段的原核表达质粒转化 *E. coli* 后, 摇菌。通过前期实验确定以 0.1 mmol/L 的 IPTG 浓度 20°C 诱导 14 h, 高速离心收菌, 全菌体蛋白超声破碎处理后, 保留菌体沉淀组作为对照。用镍离子亲和树脂吸附上清中表达的 His-mucin 16N 蛋白, 观察蛋白的可溶性表达情况。在相对分子质量 ( $M_r$ ) 约为 62 000 处出现目标蛋白(图 1), 且在破碎后的上清和沉淀中均有表达, 故在大量纯化时应尽量降低转速减少包涵体的形成, 增加可溶性的表达, 利于纯化。



1: 亲和树脂吸附上清中蛋白(诱导) 2: 亲和树脂吸附上清中蛋白(不诱导); M: 蛋白  $M_r$  marker; 3: 菌体破碎离心沉淀(不诱导); 4: 菌体破碎离心沉淀(诱导)。

图 1 诱导表达的 His-mucin 16N 融合蛋白 SDS-PAGE 分析

**2.2 His-mucin 16N 重组蛋白的纯化** 将大肠杆菌大量培养后, 用超声破碎, 取其上清过滤后与镍离子亲和树脂结合, 然后用  $1 \times \text{Ni-NTA}$  洗涤缓冲液对挂柱蛋白多次洗涤, 然后用洗脱缓冲液进行洗脱, 将缓冲液置换成 PBS 后, SDS-PAGE 电泳分析其纯度, 结果表明蛋白纯度较高(图 2), 可以用于免疫 BALB/c 小鼠。

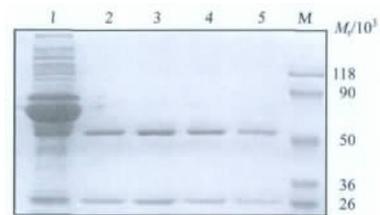


M: 蛋白  $M_r$  marker; 1: 纯化出的 His-mucin 16N 重组蛋白。

图 2 纯化的 His-mucin 16N 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

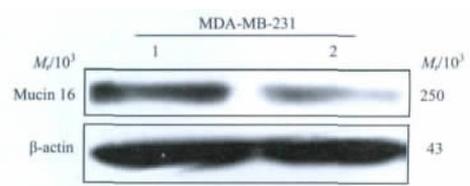
**2.3 抗 mucin 16 mAb 的制备及特异性鉴定** 经间接 ELISA 法筛选获得几株可持续、稳定分泌抗 mucin 16 mAb 的杂交瘤细胞株。挑选效价较高的 11 号抗体制备腹水并用蛋白 G 亲和层析柱纯化, 纯化后收集洗脱下来的抗体, SDS-PAGE 电泳

分析其纯度。如图 3, 可看到明显的抗体轻链 ( $M_r$  为 26 000) 和重链 ( $M_r$  为 55 000), 利用 Bio-Rad Quantity One 软件分析, 纯度在 95% 以上。用 ELISA 测定抗体效价可达 1:100 000 以上。将纯化得到的抗体经 Sigma 抗体亚型检测试剂盒检测, 为 IgG1。用纯化出的抗体做 Western blot 检测敲低 mucin 16 的 MDA-MB-231 细胞与对照 MDA-MB-231 细胞中内源性 mucin 16 的表达水平变化, 发现自制的抗体可以特异性地识别细胞内源性的 mucin 16。图 4 中, 第 2 泳道是 mucin 16 表达被敲低的细胞裂解液, 其中 mucin 16 表达量相对于第 1 泳道中未敲低 mucin 16 的对照组明显下降, 抗 mucin 16 抗体所识别的特异性条带在  $M_r$  约为 250 000 处。用抗  $\beta$ -actin 抗体识别的  $\beta$ -actin 为内参照以显示第 1 和第 2 泳道的上样量均等。这些结果表明了自制的抗 mucin 16 抗体可以识别细胞内源性的 mucin 16。



1: 纯化前的腹水; 2-5: 洗脱下来的抗体; M: 蛋白  $M_r$  marker。

图 3 纯化出的抗体 SDS-PAGE 分析



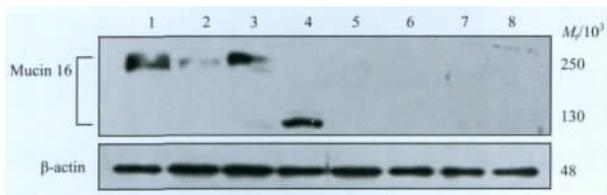
1: 正常表达 mucin 16 的 MDA-MB-231 细胞; 2: 敲低 mucin 16 的 MDA-MB-231 细胞。

图 4 自制的抗 mucin 16 mAb 可特异性地识别细胞内源性的 mucin 16

**2.4 mucin 16 在不同肿瘤细胞中的表达** 利用自制纯化的 mucin 16 mAb 检测 mucin 16 在不同肿瘤细胞中的表达水平。Western blot 法对乳腺癌细胞 (ZR-7530、SKBR-3、MCF-7), 肺癌细胞 (Spca-1、H460), 骨髓瘤细胞 (Sp2/0), 淋巴瘤细胞 (U937) 和白血病细胞 (MT-4) 等细胞进行 mucin 16 表达水平的检测。由图 5 可见, 乳腺癌细胞 (SKBR-3, MCF-7, ZR-7530) 和肺癌细胞 (Spca-1) 显示一明显特异条带,  $M_r$  分别为 250 000 和 130 000。据报道 mucin 16 可能有小的亚基, 肺癌细胞 Spca-1 识别的可能是 mucin 16 的小亚基形式<sup>[11]</sup>。其他细胞系中未检测到 mucin 16 的表达。用抗  $\beta$ -actin 抗体识别的  $\beta$ -actin 作为内参照以显示各泳道蛋白上样量一致。

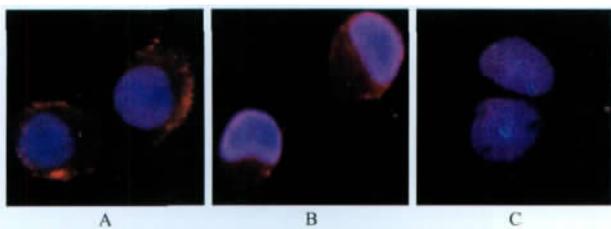
**2.5 免疫荧光和免疫组织化学检测** 用自制的抗 mucin 16 mAb 对上述 Western blot 实验所显示的 mucin 16 阳性细胞肺癌 Spca-1 和乳腺癌 SKBR-3 细胞, 以及 mucin 16 阴性细胞 H460 进行免疫荧光染色。图 6 中 Spca-1 细胞 (A) 和 SKBR-3 细胞 (B) 经自制抗 mucin 16 mAb 做免疫荧光染色, 可见细胞

膜和细胞质区域有荧光染色,而 mucin 16 阴性细胞 H460(C) 则无荧光染色,蓝色为 DAPI 标记的细胞核。表明自制抗体可用于免疫荧光检测,并且也进一步确认图 5 中的 Western blot 检测的结果。另据报道,乳腺癌组织是 mucin 16 阳性<sup>[12]</sup>,当用自制的抗 mucin 16 mAb 对乳腺癌组织切片进行免疫组化染色,在 40 倍镜下观察,可见胞质内红棕色染色,而用小鼠 IgG 抗体替代抗 mucin 16 抗体染色则无红棕色染色(图 7)。表明制备的 mucin 16 mAb 可用于免疫组化染色。



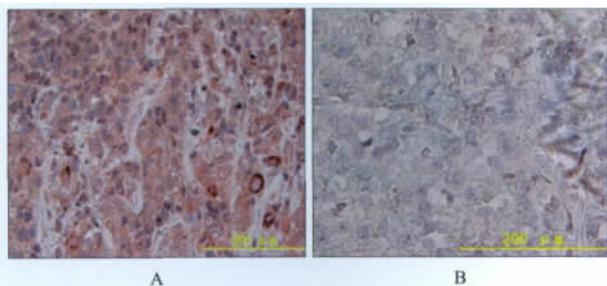
1: ZR-7530; 2: SKBR-3; 3: MCF-7; 4: Spca-1; 5: H460; 6: Sp2/0; 7: U937; 8: MT-4.

图 5 mucin 16 在不同癌细胞中的表达



A: Spca-1 细胞; B: SKBR-3 细胞; C: H460 细胞.

图 6 自制抗 mucin 16 mAb 用于免疫荧光染色(×1 000)



A: 抗 mucin 16 mAb 染色; B: IgG 染色.

图 7 自制抗 mucin 16 mAb 用于免疫组化染色(AEC, ×40)

### 3 讨论

Mucin 16 蛋白是迄今发现的  $M_r$  最大的糖蛋白,作为一种在多种癌症中过表达的糖蛋白,在过去对它的了解集中在它的胞外区可被剪切释放到血清中的片段,即 CA125 蛋白,一种通常用于卵巢癌等癌症临床检测的重要肿瘤标志物。近年来,随着对 mucin 家族的了解增多, mucin 1 和 mucin 4 等 mucin 家族成员被鉴定为癌基因且直接参与肿瘤的生长和迁移的相关过程<sup>[13]</sup>。最近几年,对 mucin 16 的研究成果表明它可能是一个潜在的肿瘤形成的直接参与者,但是人们对它的了解还非常少。在这个背景下,制

备可特异性地识别细胞内源性 mucin 16 的 mAb 对研究 mucin 16 在癌症发生和转移过程中的功能及其调控,对评估其可否作为一个肿瘤药物靶点具有重要意义。

我们选择 mucin 16 蛋白 N 端片段进行克隆并表达和纯化该重组蛋白。为了便于表达和纯化,将其构建到带有 His 标签的原核表达载体上。由于诱导时 His-mucin 16N 融合蛋白的部分形成包涵体,且培养上清中可溶性部分伴随有一定程度的降解,因此在诱导过程中降低温度和转速,最后获得较纯的 mucin 16 融合蛋白。

用上述纯化的 mucin 16 融合蛋白为免疫原对 BALB/c 小鼠进行免疫,经过细胞融合和几轮亚克隆筛选后,用间接 ELISA 筛选出效价高并可稳定分泌抗 mucin 16 mAb 的杂交瘤细胞株扩大培养,制备腹水并纯化。用 Western blot、ELISA、免疫组织化学染色、免疫荧光等方法分析和鉴定制备的抗 mucin 16 的 mAb。这些实验结果表明制备的抗体可以特异性地识别细胞内源性的 mucin 16 蛋白。对不同癌细胞株的 mucin 16 表达水平用 Western blot 法进行初步检测,结果表明 ZR-7530、MCF-7 和 Spca-1 细胞中 mucin 16 的表达量较高,在 SKBR-3 细胞中也有表达,而在骨髓瘤和白血病等细胞系中未检测到 mucin 16 的表达。这可能和 mucin 16 作为一种上皮细胞的黏附蛋白在上皮细胞起源的癌症中多见有关。在免疫荧光实验中,发现在 Western blot 实验中呈 mucin 16 阳性的细胞株(SKBR-3 和 Spca-1) 同样呈现阳性荧光染色,并有膜染色的表型。利用自制抗 mucin 16 的抗体在乳腺癌组织切片中也观察到了阳性染色。

### 参考文献:

- [1] Matsuoka Y, Endo K, Kawamura Y, *et al.* Normal bronchial mucus contains high levels of cancer-associated antigens, CA125, CA19-9, and carcinoembryonic antigen [J]. *Cancer*, 1990, 65(3): 506 - 510.
- [2] Bast RC Jr., Xu FJ, Yu YH, *et al.* CA 125: the past and the future [J]. *Int J Biol Markers*, 1998, 13(4): 179 - 187.
- [3] 高寒,姜军,杨新华,等. 5 种血清标志物的不同组合对提高乳腺癌诊断的意义[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(12): 1255 - 1257.
- [4] 崔恒. 卵巢癌的诊治及其研究策略[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2006, 7(5): 323 - 326.
- [5] 沈海滨,刘静,郭佳伟,等. CA125、CA199、CEA 联合检测对卵巢上皮癌诊断及疗效的临床分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(2): 217 - 219.

(下转 971 页)

