

• 医药生物技术 •

抗 GPC3 单链抗体的制备及其在肝细胞癌靶向检测中的应用

向新楚, 刘雪, 胡耀凯, 赵成君, 罗文新

厦门大学 生命科学学院 公共卫生学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 福建 厦门 361102

向新楚, 刘雪, 胡耀凯, 等. 抗 GPC3 单链抗体的制备及其在肝细胞癌靶向检测中的应用. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2860–2867.

Xiang XC, Liu X, Hu YK, et al. Preparation of anti-GPC3 single chain antibody for targeted detection of hepatocellular carcinoma. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2860–2867.

摘要: 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (Glypican-3, GPC3) 是 Glypican 家族的关键成员,它在肝细胞癌 (HCC) 的发展、血管生成和转移中起着重要作用。大多数 HCC 过表达 GPC3,而在正常的成人肝脏和良性肝脏病变中几乎检测不到 GPC3,因此其可以作为 HCC 高度特异性的诊断标志和理想的治疗靶标。文中将前期筛选得到的靶向 GPC3 的单克隆抗体 1B11 轻重链基因通过柔性肽 (Linker) 连接,经原核表达纯化,成功获得抗 GPC3 单链抗体 1B11-scFv。通过蛋白印迹法鉴定验证了单链抗体的表达和装配正确;流式细胞术检测其与 GPC3 阳性细胞株具有与全长抗体相当的结合活性;将单链抗体与近红外荧光探针 Cy5.5-NHS 偶联,发现其在荷瘤裸鼠体内可精准靶向肿瘤部位,提示其具有实现探针引导下的多方位肝癌精准手术导航的潜力。

关键词: 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3, 肝细胞癌, 单链抗体, 手术导航, 靶向治疗

Preparation of anti-GPC3 single chain antibody for targeted detection of hepatocellular carcinoma

Xinchu Xiang, Xue Liu, Yaokai Hu, Chengjun Zhao, and Wenxin Luo

State key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Public Health, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract: Glypican-3 (GPC3) is a key member of Glypican family and plays an important role in the development, angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC). Most HCC overexpresses GPC3, but GPC3 is hardly detected in normal adult liver and benign liver lesions, so it is regarded as a highly specific diagnostic marker and an ideal therapeutic target for HCC. In this study, we cloned the heavy and light chain variable region gene from the monoclonal antibody targeted to GPC3 screened in the previous stage, and linked it with a segment of flexible peptide (Linker) to obtain the single chain

Received: April 1, 2020; **Accepted:** June 29, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31870925).

Corresponding author: Wenxin Luo. Tel: +86-592-2188657; Fax: +86-592-2181258; E-mail: wxluo@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31870925) 资助。

网络出版时间: 2020-08-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200813.1018.001.html>

antibody against GPC3. The single chain antibody gene was cloned into vector for prokaryotic expression and purified to obtain high purity protein. Detection shows that the single-chain antibody produced by us has the same binding activity with the full-length antibody, and can accurately target the tumor site of Huh7 tumor-bearing model mice after coupling Cy5.5 fluorescence, suggesting that the single-chain antibody has the potential to realize multi-directional liver cancer precise surgical navigation under the guidance of a probe.

Keywords: GPC3, HCC, scFv, surgical navigation, targeted therapy

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 简称肝癌, 是一种与慢性肝炎病毒感染密切相关的恶性肿瘤。原发性肝癌位居全球最常见恶性肿瘤的第 5 位, 在癌症相关死亡原因中排第 3 位^[1]。我国肝癌的发病率和死亡率约占全世界的一半, 根据《2015 中国恶性肿瘤流行情况分析》显示, 肝癌位于中国男性发病第 3 位, 女性发病第 7 位^[2]。

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (Glypican-3, GPC3) 作为一种癌胚胎的抗原, 在超过 70% 的肝细胞癌中高表达, 但在良性的肝损害、肝硬化或健康成人组织中不表达^[3], 基础和临床研究均表明, GPC3 不仅是一种高度特异性的诊断性生物标志, 也可以作为其免疫治疗靶点^[3-4]。

单链抗体 (Single-chain variable fragment, scFv) 通过 15–20 个氨基酸残基的短肽 (Linker) 将抗体重链可变区和轻链可变区连接起来^[5]。单链抗体缺乏恒定区, 因此具有较低的免疫原性与较强的穿透力^[6], 同时依旧能够稳定地与抗原特异性结合并发挥作用。单链抗体相对分子质量只有 25 kDa 左右, 结构稳定, 易于生产, 表达成本较低^[7]。目前, 单链抗体由于上述优点在抗肿瘤、抗病原生物、自身免疫疾病研究等方面有着广泛的应用, 既可以与小分子药物偶联或与功能性蛋白融合表达^[8], 进行药物的靶向递送, 从而实现靶向治疗, 又可以与荧光探针偶联, 实现探针引导下的多方位精准手术导航^[9]。

本研究根据前期获得的鼠单抗 1B11 抗体可变区的氨基酸序列设计引物, 合成、克隆了 1B11 抗体轻重链可变区基因, 在大肠杆菌中表达并初步纯化, 获得了 1B11 单链抗体, 验证了其 GPC3 的相互作用, 以期为肝癌的手术导航或靶向治疗

的研发提供关键工具。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、BL21 (DE3)、ER2566、ST7 为实验室保存, 载体 pET-22b 为实验室构建。Huh7 细胞购自 ATCC, LO2 细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司; 质粒小提试剂盒购自 TIANGEN 公司。异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 和 SDS-PAGE 上样缓冲液 (还原, 6 \times) 为实验室制备; 荧光抗体: Anti-6 \times His tag[®] antibody (FITC) 及 Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC) 购自美国 Abcam 公司; APC anti-His Tag Antibody 购自美国 Biolegend 公司; Cyanine 5.5 NHS ester (Cy5.5-NHS) 购自美国 Lumiprobe 公司; Yeast Extract 和 Tryptone 购自美国 OXOID 公司, Triton X-100 购自美国 Amresco 公司。Buffer I (1 mmol/L NaCl, 200 mmol/L Tris Base, 60 mmol/L EDTA, pH 7.2) 为实验室制备。尿素及各种盐类试剂购自西陇科学股份有限公司。实验用水为美国 Millipore 纯水系统生产。电泳及酶标仪为美国 Bio-Rad 公司设备。Ivis lumina II 小动物光学成像系统为美国 PE 公司设备。

1.2 方法

1.2.1 表达质粒的构建

对实验室前期筛选到一株靶向 GPC3 的鼠单抗 1B11, 通过裂解杂交瘤细胞, 调取抗体基因并利用 IMGT V-quest 数据库进行检索比对得到了 1B11 鼠单抗的可变区序列, 将轻链和重链可变区序列优化后用 linker 连接, 并在 C 端引入 His-tag,

最终得到 1B11-scFv/His 融合蛋白单链抗体序列，并在 5'端和 3'端分别引入 *Sal* I 与 *Not* I 酶切位点(图 1)，随后交由通用生物系统(安徽)有限公司合成基因，通过酶切将目的片段插入到 pET-22b 载体中，命名为 pET-1B11-scFv。

1.2.2 单链抗体重组基因的表达鉴定

将构建好的表达载体 pET-1B11-scFv 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)、ER2566 原核表达宿主感受态细胞中，转化产物分别涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基中，于 37 °C 恒温培养过夜。挑取阳性重组质粒的多个大肠杆菌单菌落至 4 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中，在 37 °C 摇床中 220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.8。取部分菌液作为对照组，余下菌液加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，37 °C 振荡培养 3 h。留样后收集菌体，13 000 r/min 离心 2 min，弃上清，以 50 μ L PBS 重悬菌体沉淀后加入 10 μ L 6 \times SDS-PAGE 上样缓冲液(还原)，电泳检测。

1.2.3 单链抗体重组蛋白大量表达

取 SDS-PAGE 检测表达目的抗体的克隆菌液

100 μ L 接种于 4 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中，37 °C 振荡培养过夜。将培养菌液按 1: 1 000 扩大接种至 500 mL LB 液体培养基(含卡那霉素)中(共接种 2 瓶)，37 °C 振荡培养至 OD_{600} 约 0.8，冷却菌液，加入 IPTG 诱导剂至终浓度 1 mmol/L，24 °C、180 r/min 诱导 10 h。随后 7 000 \times g 离心 10 min 收集菌体，重悬于 20 mL PBS 缓冲液中。冰浴，用超声破碎仪破碎菌体，参数设置为输出功率 50 %、工作 2 s、间歇 4 s，共作用时间 10 min。25 000 \times g、4 °C 离心 10 min，收集上清液以及沉淀，取少量上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 包涵体蛋白的洗涤纯化及 SDS-PAGE 检测

重组蛋白以包涵体形式进行表达。将菌体破碎离心后的沉淀用 20 mL 1% Triton X-100/Buffer I 重悬，冰上搅拌 30 min，25 000 \times g、4 °C 离心 10 min，弃上清，重复上述步骤一次后以等体积 Buffer I 重悬沉淀，冰上搅拌 30 min，25 000 \times g、4 °C 离心 10 min，弃上清，重复一次后以等体积的 2 mol/L 尿素/PBS 缓冲液溶解沉淀，冰上搅拌 60 min，25 000 \times g、4 °C 离心 10 min，收集上清。

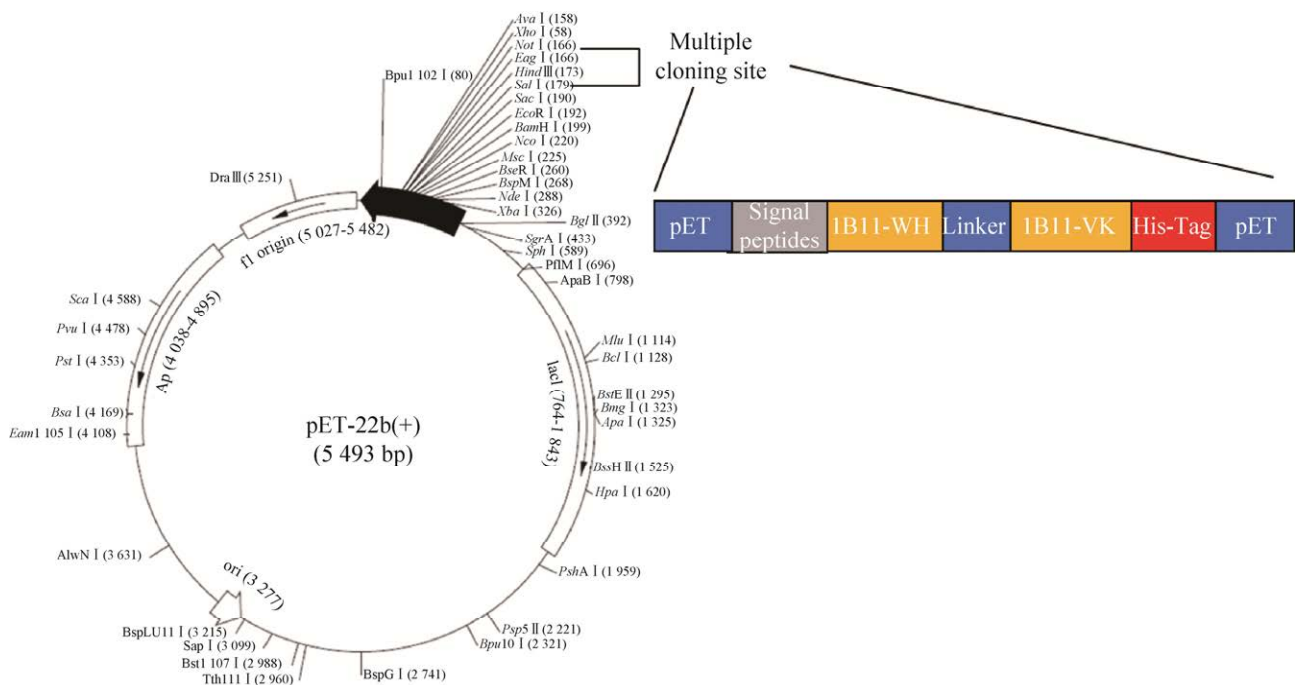


图 1 1B11 单链抗体质粒构建

Fig. 1 Construction of 1B11 scFv plasmid.

沉淀以 15 mL 4 mol/L 尿素/PBS 缓冲液溶解, 冰上搅拌 60 min, 25 000×g、4 °C 离心 10 min, 收集上清, 沉淀以 10 mL 8 mol/L 尿素/PBS 缓冲液溶解, 冰上搅拌 60 min, 25 000×g、4 °C 离心 10 min, 收集上清和沉淀。取各次收集的上清液及最后一次收集的沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 包涵体蛋白的复性

将蛋白溶液逐步透析至 6 mol/L 尿素/PBS 缓冲液、4 mol/L 尿素/PBS 缓冲液、2 mol/L 尿素/PBS 缓冲液及 PBS 缓冲液中, 透析条件为 4 °C、6–8 h。透析条件从 2 mol/L 尿素/PBS 缓冲液变为 PBS 缓冲液时, 每 2 h 换液一次, 共换液 4 次。取蛋白溶液进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.6 复性蛋白纯化

蛋白溶液用 0.22 μm 滤器过滤备用, 准备 Ni-NTA 柱, 以 1 mL/min 的流速上样上清蛋白溶液, 以 PBS/NaCl 缓冲液洗柱至 UV 读值降至基线且稳定不变; 分别以 20 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、250 mmol/L 和 500 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱, 分段收集洗脱液。

1.2.7 复性后抗体蛋白的结合活性评估

胰酶消化人正常肝细胞 LO2、人肝癌细胞 Huh7, 各取 100 μL 3×10^5 细胞于 1.5 mL Ep 管中, 按 1: 1 000 加入 2 mg/mL 抗体蛋白, 37 °C 孵育 1 h。1 000 r/min 离心 5 min, 小心弃上清。500 μL PBS 重悬, 吹吸均匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 小心弃上清, 重复 3 次。按 1: 2 000 比例稀释二抗 (1B11 全长抗体采用 Goat Anti Mouse IgG H&L FITC, 1B11-scFv 采用 APC anti-His Tag Antibody), 500 μL/管加入 Ep 管中, 室温避光孵育 30 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 小心弃上清。500 μL PBS 重悬, 吹吸均匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 小心弃上清, 重复 3 次后用 500 μL PBS 重悬细胞, 最后上机进行流式检测, 使用 Flowjo V10.0 软件分析检测结果。

1.2.8 免疫荧光法检测单链抗体体外靶向性

胰酶消化人肝癌细胞 Huh7 细胞和正常肝细

胞 LO2 细胞, 铺于 Cell Carrier-96 Black 高内涵细胞培养板 (1×10^4 /孔) 中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h; 弃去培养基, 加入 100 μL/孔的 4% 多聚甲醛固定 15 min, 后用 200 μL PBS 漂洗 5 次, 5 min/次; 1: 200 稀释单链抗体 1B11-scFv, 室温孵育 1 h 后 PBS 漂洗 5 次 (5 min/次); 随后用 2% BSA 稀释液按 1: 2 000 稀释二抗 (FITC anti-6× His Tag Antibody) 室温避光孵育 30 min, 再用 PBS 漂洗 5 次 (5 min/次); 漂洗完毕后, 用 PBS 1: 2 000 稀释 DAPI, 50 μL/孔室温孵育 5–10 min, 再用 PBS 漂洗 5 次; 最后加入 500 μL PBS 使用 Opera Phenix 高内涵细胞筛选成像系统进行分析。

1.2.9 偶联花青素 5.5 (Cy5.5) 的单链抗体在荷瘤小鼠模型中的靶向性评估

使用 Cy5.5-NHS 试剂盒将荧光探针与 1B11-scFv 偶联, 制备成 1B11-scFv-Cy5.5。选取 5 周龄的 Balb/C 裸鼠作为实验动物, 于右后侧腿外侧皮下接种 100 μL 的 1×10^7 Huh7 细胞悬液。确保水和饲料充足于 P2 级别鼠房中饲养, 监测肿瘤大小。大约 2 周时间后, 即肿瘤体积达到 80 mm³ 后, 小鼠经尾静脉注射 1B11-scFv-Cy5.5, 2 h 后, 放入小动物活体成像仪中, 对其进行荧光成像。随后, 取出小鼠的主要脏器和肿瘤组织, 进一步揭示 1B11-scFv-Cy5.5 在小鼠体内的生物分布。

2 结果与分析

2.1 单链抗体的表达载体选择

将重组质粒分别转化感受态细胞 BL21 (DE3)、ER2566, 过夜培养后挑选含重组质粒的单菌落, 少量培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8, 取部分菌液作为对照组, 余下菌液加入 IPTG 诱导剂, 经 3 h 培养后离心取菌体裂解后进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示在 IPTG 的诱导下重组蛋白进行了表达 (图 2)。

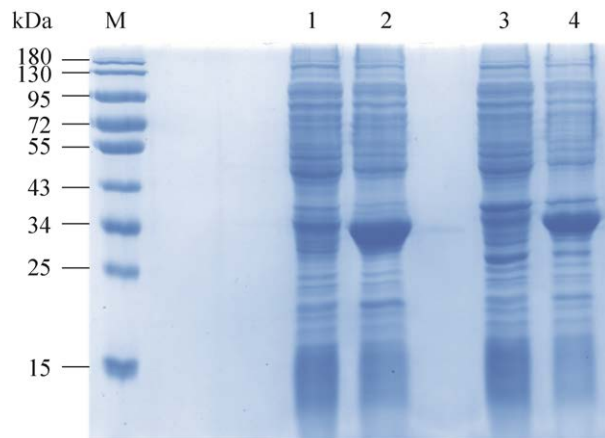


图2 单链抗体小量诱导表达 SDS-PAGE 图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of small amount induced expression of scFv. M: marker; 1: bacterial solution of ER2566 without induction; 2: bacterial solution of ER2566 after induction; 3: bacterial solution of BL21 (DE3) without induction; 4: bacterial solution of BL21 (DE3) after induction.

2.2 单链抗体的表达和纯化

取 ER2566 及 BL21 (DE3) 保存的阳性克隆菌株进行扩大培养, 收集菌体后进行破碎释放蛋白, 经高速离心, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示重组蛋白主要以包涵体形式进行表达 (图 3)。

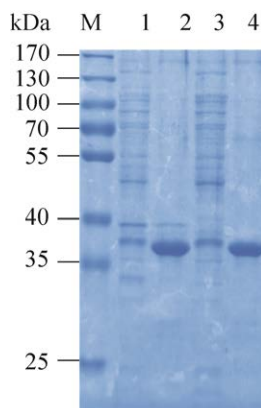


图3 单链抗体大量表达菌体破碎上清液及沉淀 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fragmented supernatant and precipitation of scFv expressed in large amount. M: marker; 1: supernatant of lysed bacteria after BL21 (DE3) induction; 2: precipitation of lysed bacteria after BL21 (DE3) induction; 3: supernatant of lysed bacteria after ER2566 induction; 4: precipitation of lysed bacteria after ER2566 induction.

大量表达获得的重组蛋白包涵体经复性、Ni-NTA 纯化技术及浓缩得到重组蛋白 2 mg, 经 SDS-PAGE 检测可见其纯度达到 90%, 考马斯亮蓝染色几乎未见明显杂带 (图 4)。

2.3 流式细胞术验证 1B11-scFv 的体外结合活性

我们选择其中一株表达自 BL21 (DE3) 菌株的单链抗体进行了流式检测, 鉴定其结合活性。用全长抗体 1B11 作为阳性对照, 结果显示表达的 1B11 单链抗体与 GPC3 阳性细胞株具有与全长抗体相当的结合活性, 且均不与正常肝细胞 LO2 (不表达 GPC3) 结合 (图 5)。

2.4 免疫荧光检测 1B11-scFv 的体外靶向性

随后, 通过免疫荧光法评估单链抗体的体外靶向性, 实验结果如图 6 所示。从结果可以看出, 1B11-scFv 可以完全结合在表达 GPC3 的 Huh7 细胞表面, 经 FITC anti-His 抗体检测可在膜部位显示绿色荧光。以不表达 GPC3 的正常肝细胞 LO2 作为阴性对照, 无绿色荧光显示, 仅有细胞核蓝染显示。这提示我们 1B11-scFv 可能具有手术导航的潜力。

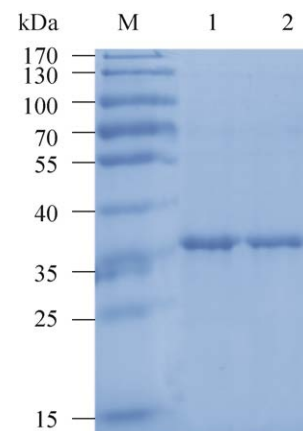


图4 重组蛋白复性、纯化和浓缩后的 SDS-PAGE 图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis after refolding, purification and concentration of inclusion bodies. M: marker; 1: 1B11 scFv expressed from BL21; 2: 1B11 scFv expressed from ER2566.

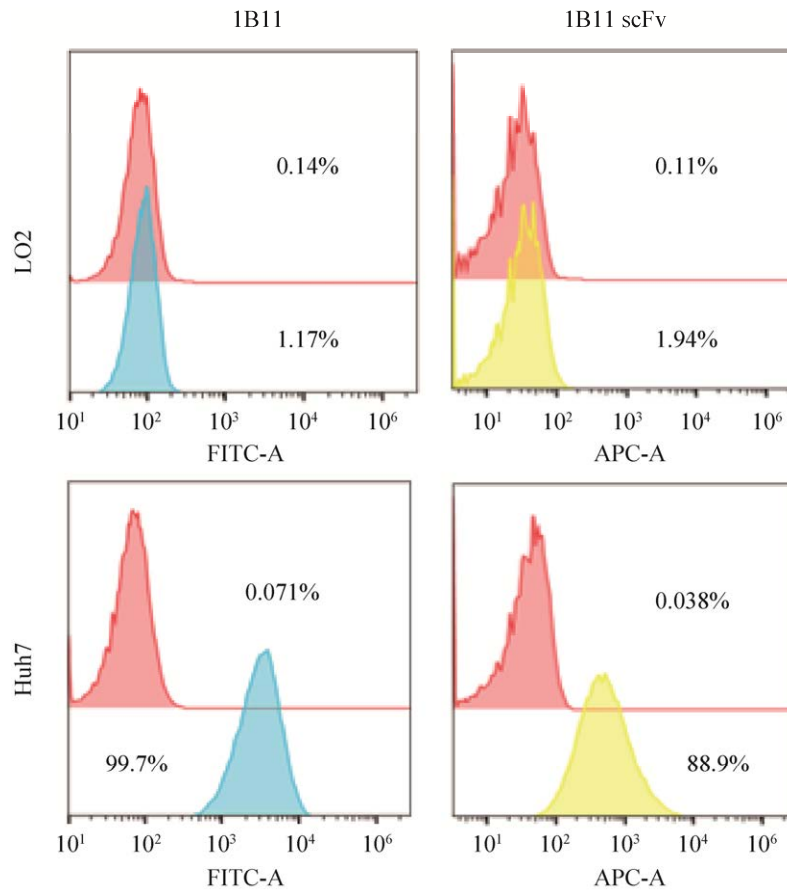


图 5 重组蛋白复性后与肝癌细胞及正常肝细胞的结合活性验证

Fig. 5 Verification of binding activity of recombinant protein to hepatocellular carcinoma cells and normal hepatocytes after refolding.

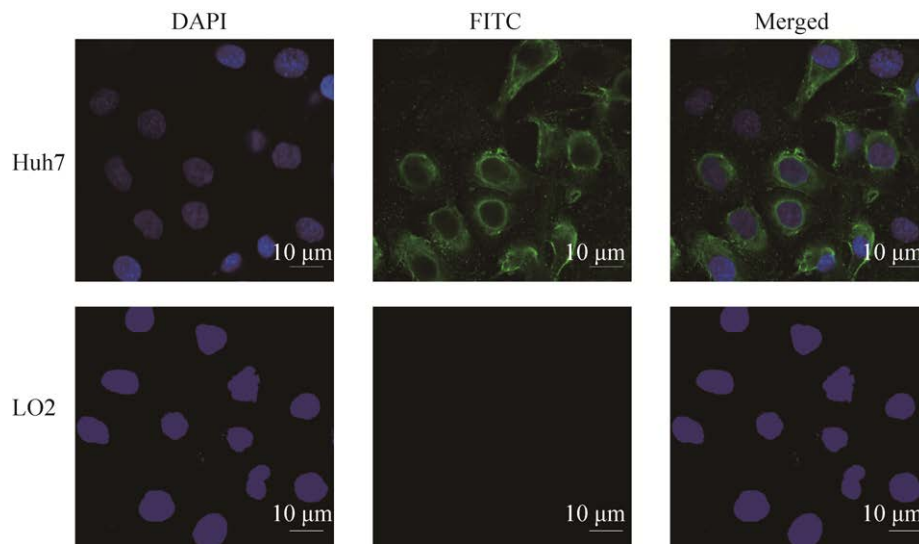


图 6 细胞免疫荧光法验证单链抗体生物学活性

Fig. 6 Verification of biological activity of single chain antibody by cellular immunofluorescence.

2.5 活体荧光成像验证 1B11-scFv 的体内靶向性

选取成瘤效果好的 Huh7 荷瘤小鼠，在避光条件下经尾静脉分组分别注射 100 μL 的 1B11-scFv-Cy5.5，以游离 Cy5.5 作为对照，2 h 后使用小动物活体成像系统分别进行活体成像。监测、记录 Cy5.5 荧光成像结果，如图 6 所示。

活体成像结果可看出，1B11-scFv-Cy5.5 对肿瘤部位具有非常好的靶向性，能够准确定位到右后侧腿的皮下瘤处。随后，取小鼠主要脏器和肿瘤组织，并对其近红外荧光成像，发现 1B11-scFv-Cy5.5 组在肿瘤部位有很好的富集。这些结果均表明其具有在荧光探针引导下的多方位肝癌精准手术导航的应用潜力。

3 讨论

恶性肿瘤是当今世界最严重的公共卫生问题，而肝癌一直是患病人数最多、致死率最高的恶性肿瘤之一。但由于肝癌的基因组不稳定及高度异质性导致其缺乏有效的早期诊断方法，以致于大多数患者被确诊时已是肝癌晚期^[10]。GPC3 由于在肝癌细胞中特异性高表达，因此被作为

HCC 高度特异性的诊断标志和理想的治疗靶标。

虽然目前已有多项研究将完整的单克隆抗体应用于 HCC 成像^[11-12]，但基于单抗的放射性核素分子成像探针在原位肿瘤异种移植模型中的检测并不理想，这在很大程度上是因为这些成像探针在肝脏中的代谢。因此，小分子探针对于肿瘤检测将是非常有益的。有研究使用近红外荧光探针 Cy5.5 与结合 GPC3 的肽进行标记，可检测到 Cy5.5-肽在表达 GPC3 的肿瘤异种移植小鼠中具有较高的肿瘤部位积累^[13]。然而，多肽的制备过程较为复杂，且不能够保证肽与 GPC3 之间的确切结合亲和力。相对来说，单链抗体具有和完整抗体一样的抗原亲和力，且结构稳定，易于生产，表达成本较低，因此使用单链抗体偶联荧光染料对肝癌进行诊断是一个较好的选择。同时，单链抗体还具有以下优点：没有 Fc 区，免疫原性弱，不易引起超敏反应和排斥反应；不与非靶细胞的 Fc 受体结合，在影像分析中非特异性结合少；清除快，用作造影时对周围组织损伤小；相对分子质量小，容易穿透血管壁到达肿瘤内部^[14]等。

尽管荧光染料具有不良组织的渗透性，但是与基于放射性核素的成像相比，使用多种荧光染

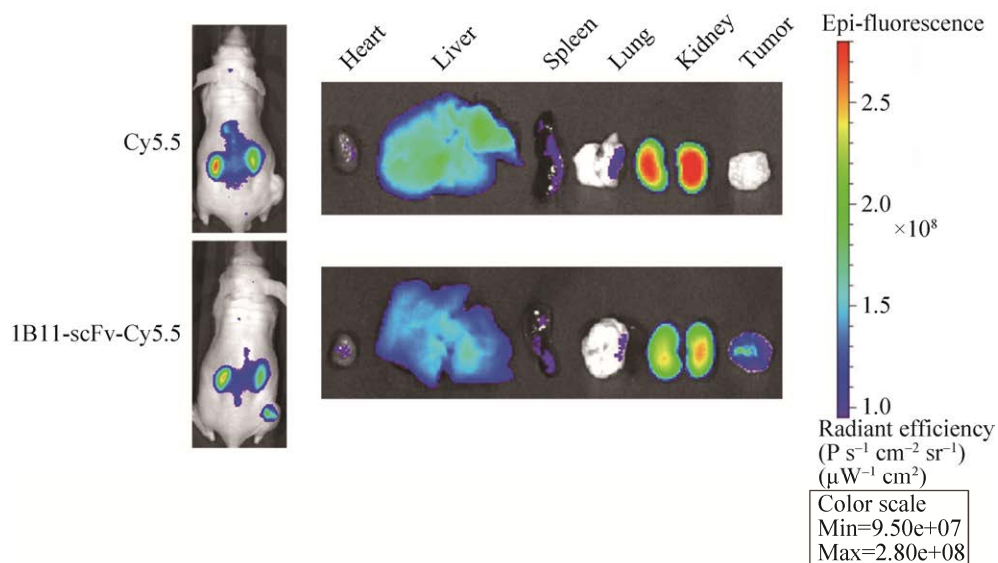


图 7 小鼠 Cy5.5 荧光成像

Fig. 7 Fluorescence imaging of Cy5.5 in mice.

料的光学成像能够进行多通道成像,并能进行相对快速且经济高效的临床前评估。因此,它在临床前肿瘤检测以及探针的体内评估中发挥着越来越重要的作用^[15-17]。

本研究中,我们将前期筛选得到的靶向 GPC3 的单克隆抗体克隆出轻重链可变区基因,并通过一段柔性肽 (Linker) 连接得到抗 GPC3 的单链抗体。将此单链抗体基因克隆至载体 pET-22b 进行原核表达,经过纯化后得到了高纯度的蛋白。经检测发现,我们所生产单链抗体与全长抗体具有相同的结合活性,将单链抗体与近红外荧光探针 Cy5.5-NHS 偶联,发现其在荷瘤裸鼠体内可精准靶向肿瘤部位,提示其具有实现探针引导下的多方位肝癌精准手术导航的潜力。同时,1B11-scFv 后续还可与小分子化学药物偶联从而实现药物的靶向递送,降低药物的毒副作用。

REFERENCES

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*, 2001, 94(2): 153–156.
- [2] Zheng RS, Sun KX, Zhang SW, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015. *Chin J Oncol*, 2019, 41(1): 19–28 (in Chinese).
郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19–28.
- [3] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2003, 125(1): 89–97.
- [4] Zhu AX, Gold PJ, El-Khoueiry, et al. First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4): 920–928.
- [5] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 1988, 242(4877): 423–426.
- [6] Nisbet RM, van der Jeugd A, Leinenga G, et al. Combined effects of scanning ultrasound and a tau-specific single chain antibody in a tau transgenic mouse model. *Brain*, 2017, 140(5): 1220–1230.
- [7] Huang J, Zhang KC, Liu XD, et al. Research progress on single-chain antibody and its application. *Anim Husb and Feed Sci*, 2014, 35(11): 49–52 (in Chinese).
黄静, 张括川, 刘晓丹, 等. 单链抗体的研究进展及其应用. *畜牧与饲料科学*, 2014, 35(11): 49–52.
- [8] Yazaki PJ, Kassa T, Cheung CW, et al. Biodistribution and tumor imaging of an anti-CEA single-chain antibody-albumin fusion protein. *Nucl Med Biol*, 2008, 35(2): 151–158.
- [9] Chester K, Pedley B, Tolner B, et al. Engineering antibodies for clinical applications in cancer. *Tumor Biol*, 2004, 25(1/2): 91–98.
- [10] Fu J, Wang HY. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China. *Cancer Lett*, 2018, 412: 283–288.
- [11] Yang XY, Liu HG, Sun CK, et al. Imaging of hepatocellular carcinoma patient-derived xenografts using ⁸⁹Zr-labeled anti-glypican-3 monoclonal antibody. *Biomaterials*, 2014, 35(25): 6964–6971.
- [12] Sham JG, Kievit FM, Grierson JR, et al. Glypican-3-targeted ⁸⁹Zr PET imaging of hepatocellular carcinoma. *J Nucl Med*, 2014, 55(5): 799–804.
- [13] Zhu DL, Qin YS, Wang JJ, et al. Novel glypican-3-binding peptide for *in vivo* hepatocellular carcinoma fluorescent imaging. *Bioconjugate Chem*, 2016, 27(3): 831–839.
- [14] Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, et al. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*, 1992, 52(12): 3402–3408.
- [15] Frangioni JV. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(5): 626–634.
- [16] Liu ZF, Liu SL, Niu G, et al. Optical imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ expression with near-infrared fluorescent RGD dimer with tetra (ethylene glycol) linkers. *Mol Imaging*, 2010, 9(1): 21–29.
- [17] Gao D, Gao LQ, Zhang CR, et al. A near-infrared phthalocyanine dye-labeled agent for integrin $\alpha v \beta 6$ -targeted theranostics of pancreatic cancer. *Biomaterials*, 2015, 53: 229–238.

(本文责编 郝丽芳)