论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0410-04

利用酵母双杂交筛选与DAT1的LIM2相互作用的蛋白质

惠 玲[1],季朝能[2],蔡文琴[1],顾少华[2],应 康[2],谢 毅[2],毛裕民[2] ([1]第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[2]复旦大学生命科学院遗传所,上海 200433)

提 要:目的 利用酵母双杂交系统筛选人胎脑组织中能与多巴胺相关转录因子DAT1的LIM2相互作用的蛋白质,以初步了解DAT1的功能。**方法** 构建酵母双杂交诱饵质粒pLexA-LIM2,筛选人胎脑cDNA文库,并用酵母交配试验初步验证。**结果** 获得3个能与DAT1的第2个LIM结构域LIM2结合的相互作用蛋白,通过酵母结合试验证实了它们在酵母中的结合。**结论** DAT1的第2个LIM结构域LIM2可与唐氏综合征关键区基因2(Similar to Down syndrome critical region gene2, DSCR2)、钙-整合素结合蛋白(calcium and integrin binding protein, CIB)、和HSPC170($CD34^+$ hematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)结合。

关键词: 多巴胺相关转录因子;LIM结构域;酵母双杂交系统

中图法分类号: R341; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Identification of DAT1/LIM2-interacting proteins by yeast two-hybrid screening

HUI Ling[1], JI Chao-neng[2], CAI Wen-qin[1], GU Shao-hua[2], YING Kang[2], XIE Yi[2], MAO Yu-min[2] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Genetics, College of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To understand the functions of a novel gene, dopamine-associated transcription factor (DAT1). **Methods** The bait plasmid pLexA-LIM2 was constructed and used to screen the human fetal brain cDNA expressing library using yeast two-hybrid. The interaction between LIM2 and positive clones were verified by yeast mating. **Results** Three proteins were isolated as interacting proteins of DAT1/LIM2. Yeast mating proved that LIM2 of DAT1 could interact with the three proteins in yeast. **Conclusion** Calcium and integrin binding protein (CIB), similar to Down syndrome critical region gene 2 (DSCR2) and HSPC170 can interact with DAT1/LIM2 in yeast.

Key words: Dopamine-associated transcription factor; LIM domain; yeast two-hybrid system

多巴胺相关神经特异性转录因子(dopamine-associated transcription factor, DAT1)是我室获得的星形胶质细胞在多巴胺作用下发生反应性变化时差异表达的两条新基因之一[1]。生物信息学分析表明,该基因是仅有两个LIM结构域的LIM家族转录调节因子,该蛋白分子中除LIM结构域外无其他结构域同源序列,属于LIM蛋白超家族中的LIM-only (LMO)亚家族。

LIM蛋白中的LMO亚家族是最近几年才克隆出来的基因,目前为止有4个成员(LMO1 ~ LMO4)。对LMO蛋白的功能研究表明,该类蛋白是一种蛋白相互作用的适配器,它的LIM结构域在不同器官、组织及生物的不同发育时期可与核内广泛分布的LIM结构域结合蛋白(Ldb)及其他的蛋白因子结合形成转录复合体,通过调控特定的下游靶基因的表达,从而参与不同组织细胞的分化、发育过程,并与肿瘤的形成有关。

由于DAT1属于LMO家族的新成员,受多巴胺(dopamine, DA)的刺激上调表达,我们的研究表明DAT1在大鼠中枢神经系统广泛表达[2],推测DAT1可能通过与其他转录因子或蛋白结合成蛋白复合体,调控相关基因的转录表达,从而参与对神经活动的调节。我们通过酵母双杂交在人脑cDNA酵母表达文库中筛选DAT1的相互作用因子,初步获得了能与DAT1相互作用的一些蛋白质序列,为初步了解DAT1的功能提供了线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒、cDNA文库 含有全长DAT1的质粒pcD-

基金项目:国家自然科学青年基金资助项目(30400125)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400125)

作者简介:惠 玲(1969-),女,陕西省蒲城县人,博士,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究,现在兰州军区兰州总医院医学科学实验中心工作。电话:(023)68752232

通讯作者:蔡文琴,E-mail: wenqin@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-12-21;修回日期:2005-02-20

NA4/HisA-DAT1 由本室构建，大肠杆菌 DH5α 由复旦大学遗传所基因工程重点实验室保存提供，酿酒酵母 EGY48 菌株、酿酒酵母 YM4271 菌株来自美国 Clontech 公司的 MATCHMARKER pLexA 试剂盒。

pLexA、pB42AD 及各种对照质粒来自美国 Clontech 公司的 MATCHMARKE 试剂盒，人胎脑 MATCHMARKER cDNA 文库来自 Clontech 公司，是以 pB42AD 为载体构建的质粒文库。

1.1.2　培养基及其他生物化学及分子生物学试剂　　各种酵母选择性培养基及 YPD 培养基构自 CLONTECH 公司。细菌培养基为自行配制。限制性内切酶、连接酶、等分子生物学试剂分别购自大连宝生物工程有限公司、上海生工公司，其它试剂为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　酵母双杂交诱饵质粒的构建及自身激活鉴定　　根据 DAT1 基因的序列及 pLexA 的克隆位点，选用 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ作为克隆位点，在 DAT1 的第 2 个 LIM 结构域（LIM2）的两端设计分别含有 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点的引物 F1（5′-ggaattcagcatcaagatcaatcgagtagatccc-3′）和 R1（5′-ttgcggccgcctgttcacgca tcacagtcagccacag-3′），以 pcDNA4/HisA-DAT1 为模板进行 PCR。扩增出含有 LIM2 序列的目的片段。扩增产物及酵母诱饵质粒经酶切、连接成重组质粒，测序验证融合质粒 pLexA-LIM2 克隆的正确性。转化酵母菌检测质粒的自身激活。

1.2.2　酵母感受态的制备、诱饵质粒及文库质粒的转化　　按照 Clontech 公司提供的酵母双杂交系统说明书（MATCHMAKER pLexA two-Hybrid User Manual 和 yeast Protocols Handbook）制备 EGY48（内含 p8op-LacZ 报告基因）感受态细胞，将 pLexA-LIM2 质粒先转化入 EGY48（p8op-LacZ），挑选阳性转化克隆，再转入人胎脑文库质粒。

1.2.3　酵母双杂交 Leu + 、Lac + 阳性候选克隆的筛选　　转化的细胞涂布 SD/-His/-Trp/-Ura 营养缺陷型平板，培养 2 ~ 3 d 以增殖细胞，再将转化产物刮下并涂布到加有 X-Gal 的 SD/Gal/Raf/-His/-Trp/-Ura/-Leu 营养缺陷型诱导平板上培养，将挑取的蓝色单菌落在 SD/-His/-Trp/-Ura 平板上划线培养 3 次，然后挑取少量到加有 X-Gal 的 SD/Gal/Raf/-His/-Ura 营养缺陷型诱导平板上培养观察，初步获得 Leu + 、Lac + 阳性候选克隆。

1.2.4　酵母双杂交阳性候选克隆靶 DNA 片段的分析及测序　　筛选出的阳性菌落用 pB42AD 外侧通用引物进行单菌落 PCR，从 PCR 结果中挑选条带单一的 PCR 产物，以 pB42AD 载体内侧测序引物测序，将测序结果用 BLAST 数据库工具检索 nr 数据库，确定插入片段的性质。

1.2.5　酵母双杂交阳性克隆的验证（酵母菌交配试验）　　将测序验证的阳性克隆挑取少许菌落到 3 ml SD/-Trp/-Ura 液体培养基中，30 ℃振荡培养 2 d，以随机丢失 pLexA-LIM2 质粒。将产物涂布在 SD/-Trp/-Ura 营养缺陷型诱导平板上培养，挑取 20 个菌落分别在 SD/-Trp/-Ura 和 SD/-His/-Trp/-Ura 营养缺陷型诱导平板上划线培养。选取完全丢失 pLexA-LIM2 质粒而只含有 pB42AD 文库质粒的菌株，将所得到的菌株分别在 SD/Gal/Raf/-Trp/-Ura 营养缺陷型诱导平板上划线培养，观察是否有自激活现象，不发生自激活的菌株用于酵母菌结合试验。

将 pLexA-LIM2 质粒用 LiAc 法转化酵母菌株 YM4271，并在 SD/-His 营养缺陷型平板上培养。分别挑取少量含有 pB42AD 文库质粒的 EGY48（p8op-LacZ）菌株（MATα 交配型）菌落到含有 pLexA-LIM2 质粒的 YM4271 菌株（MATa 交配型）的 0.5 ml YPD 培养基中培养过夜，将交配反应产物涂布到加有 X-Gal 的 SD/Gal/Raf/-His/-Trp/-Ura/-Leu 营养缺陷型诱导平板上，培养 3 ~ 5 d，观察蓝色菌落的出现。

2　结果

2.1　诱饵蛋白表达载体的构建和自激活活性检测

从质粒 pTrip-DAT1 上将编码 DAT1 第 2 个 LIM 结构域的序列 LIM2 通过 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点克隆到酵母双杂交载体 pLexA 中，并转化大肠杆菌克隆菌株 DH5α，得到表达 LexA 结合结构域与 LIM2 融合蛋白（诱饵蛋白）的载体 pLexA-LIM2，用 pLexA 载体测序引物测序，证实质粒结构正确。

将 pLexA-LIM2 质粒用 LiAc 法转化酵母双杂交报告菌株 EGY48（p8op-LacZ）后涂布 SD/-His/-Ura 营养缺陷型平板。菌落生长良好，说明该融合蛋白对该酵母菌株无毒性，然后将阳性的菌落涂布在加有 X-Gal 的 SD/Gal/Raf/-His/-Ura 营养缺陷型诱导平板，酵母菌落不变蓝，证明 LexA-LIM2 融合蛋白对酵母宿主中无自激活作用。

2.2　DAT1/LIM2 相互作用蛋白的筛选

将含人胎脑 cDNA 的 pB42AD 文库质粒用 LiAc 法转化到转有 pLexA-LIM2 质粒的酵母菌株 EGY48（p8op-LacZ）后，涂布 SD/-His/-Trp/-Ura营养缺陷型平板。经测定文库质粒的转化效率达到 1.5×10^7 cfu/μg。从平板上收集酵母菌并滴定后，取 1.5×10^7 个转化子涂布到加有 X-Gal 的 SD/Gal/Raf/-His/-Trp/-Ura/-Leu 营养缺陷型诱导平板。共得到约 300 个阳性克隆，选择 150 个用 pB42AD 外测通用引物进行菌落 PCR（图 1），去除重复序列，选择条带单一的 PCR 产物 30 个用内侧通用测序引物进行测序，通过 Blast 分析序列的性质、比较测序序列与载体的激活域序列是否有正确读框，得到 4 个非重复序列。



图 1　阳性候选克隆的菌落 PCR 鉴定

Fig 1　Positive clones to eliminate duplicate colonies bearing the same AD/library plasmid identified by PCR

2.3　酵母结合试验验证及交配特性鉴定

将 4 个测序确定的可能的阳性克隆在 SD/-Trp/-Ura 液体培养基中培养以随机丢失 pLexA-LIM2 质粒。挑取完全丢失 pLexA-LIM2 质粒而只含有 pB42AD 文库质粒的 EGY48（p8op-LacZ）菌株，并在相应的诱导平板上划线，其中 1 个克隆显示为有自激活活性，丢弃，其余 3 个克隆所带有的 pB42AD 文库质粒本身并不能激活 p8op-LacZ 报告质粒，这 3 个克隆分别是 CIB/ISBP/KIPcalmyrin、唐氏综合征关键区基因 2（Similar to Down syndrome critical region gene2，DSCR2）和 HSPC170（$CD34^+$ hematopoietic stem/progenitor cells，HSPCs）。结果如表 1 所示。

表 1 DAT1 酵母双杂交筛选阳性克隆测序结果

Tab 1 Sequencing results of DAT1/LIM2-interacting protein in yeast two-hybrid screening

Code	GenBank	Name	Feature
70	HSU82226	CIB	Related to apoptosis, cell cycle, signing, neuronal development
69	NM-003720	DSCR2	Related to cell proliferation
76	AF229068	HSPC170	Obtained from $CD34^+$ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs)

将转化有 pLexA-LIM2 的 YM4271 菌株，在 SD/Gal/Raf/-Trp/-Ura营养缺陷型诱导平板上划线，30 ℃倒置培养观察是否有自激活现象。结果无自激活作用。将不发生自激活作用的 YM4271 菌株（MATa 交配型）菌株和分别含有表 1 所示的 3 个 pB42AD-CIB 文库质粒的 EGY48（p8op-LacZ）菌株（MATα 交配型）菌落进行交配试验。在诱导培养基上观察两倍体的酵母结合子的生长及颜色变化，发生相互作用的交配克隆呈不同程度的蓝色（以 + 表示），不能发生相互作用的交配克隆呈现白色。结果表明 CIB、DSCR 及 HSPC 均可与 DAT1 的 LIM2 在酵母中发生相互作用，70（CIB）、69（DSCR2）、76（HSPC170）与 DAT1 的 LIM2 的酵母交配试验结果分别为：（++），（+++），（++）。

3 讨论

LIM 结构域作为一种分子接头，在蛋白与蛋白之间的相互作用中发挥了重要作用，对 LIM 蛋白在机体中功能的认识也是在 LIM 蛋白与其相互作用因子的研究中获得的。LMO4 是 Kenny 等[3]用 NL1 的 LID 结构域通过酵母双杂交所发现的 LIM 蛋白，它与 NL1 结合后可以增强其在核内的存留时间；随后以 LMO4 为诱饵筛选到了 DEAF-1（deformed epidermal autoregulatory factor-1），LMO4 通过与 DEAF-1C 端的富含脯氨酸的结构域结合而与 DNA 发生相互作用[4]；最近 Sum 等[5]报道 LMO4 可与 CtIP（CtBP-Interacting protein）和乳腺肿瘤抑制蛋白（breast cancer 1, BRCA1）相互作用形成复合体，从而调节 BRCA1 在乳腺组织中的活性。

不同转录调节因子的组织特异性结合可以调节不同组织发育所需的靶基因的表达，这种调节部分依赖于与其他蛋白质结合形成的多蛋白复合体对不同启动子元件的启动。LIM 蛋白作为一种关键的结合分子，以不同的结合模式与许多不同的转录因子结合而发挥作用。首先，LIM 蛋白之间可借助 LIM 结构域相互作用，如 CRP 可通过自身的 LIM 结构域形成二聚体；第二，LIM 蛋白可与多种转录因子相互作用，如核内 LMO 蛋白 LMO4 可与 CtIP 及 CtIP 的相关蛋白乳腺癌抑制子 BRCA1 相互作用，在乳腺的发育调节及乳腺肿瘤的发生中有重要作用；第三，核内 LIM 蛋白还可以与其它不直接与 DNA 结合的协同因子相互作用；第四，LIM 蛋白可与受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinase, RTK）和蛋白激酶 C（protein kinase C, PKC）相互作用，而使 LIM 蛋白参与多种信号途径。因此，LIM 蛋白可通过与多种蛋白的相互作用，形成蛋白复合体而在机体中发挥重要作用。

酵母双杂交系统（yeast two-hybrid system）自建立以来已经成为分析蛋白质相互作用的强有力的方法之一，在近几年来得到了广泛运用。由于该方法的不断完善，如今它不但可用来在体内检验蛋白质间的相互作用，而且还能用来发现新的作用蛋白质，对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测到，它是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术。

酵母双杂交系统的建立是在真核模式生物酵母中进行的，是基于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。反式转录激活因子，在结构上是组件式的（modular），往往由两个或两个以上结构上可以分开，功能上相互独立的结构域构成，其中 DNA 结合结构域（DNA binding domain, DNA-BD）结合于特异的启动子序列，转录激活结构域（activation domain, DNA-AD）引导 RNA 聚合酶 II 复合体转录 mRNA，这两个区域对于基因激活都是必须的，将它们分开时仍分别具有功能，但不能激活转录，只有当被分开的两者通过适当的途径在空间上较为接近时，才能重新呈现完整的转录因子活性，并启动下游基因得到转录。

由于某些蛋白质在酵母菌株中表达时可能对酵母产生一定的毒性主要，使酵母细胞不能在选择性培养基上生长，另外，本身就有结合转录激活活性的蛋白质会直接激活报告基因的表达，不能作为诱饵蛋白筛选 cDNA 文库，我们将诱饵质粒转入菌株 EGY48（p8op-LacZ）后的检测表明，融合蛋白对该酵母菌株无毒性，在酵母宿主中无自激活作用，可以用于文库的筛选。

我们用 DAT1 基因的第 2 个 LIM 结构域 LIM2 作为诱饵蛋白进行酵母双杂交以筛选 DAT1 的相互作用因子，共获得 3 个可能与 DAT1 相互作用的蛋白：DSCR2、钙-整合素结合蛋白（calcium and integrin binding protein, CIB）、和 HSPC170，在酵母交配试验中验证了它们均可与 DAT1 的第 2 个 LIM 结构域 LIM2 相互作用。

DSCR2 也称为 C21-LRP（chromosome 21-leucine rich protein）是从 21 号染色体的 DSCR-2 区，即唐氏综合征识别区（Down syndrome critical region-2）克隆出来的一个较为保守的基因，定位于 21q22.3，全长 1 146 bp，DSCR2 在人胚胎的肺、脑、睾丸、肾脏、肝、心脏、骨骼肌及脾中表达[6]；在小鼠胚胎发育的整个过程中均有表达，在成年主要表达于睾丸、肾脏、肝、脑、心脏、骨骼肌

和胰腺；对 T98G 和 Jurkat 细胞系不同培养条件下细胞周期的变化与 DSCR2 的表达关系的研究表明，DSCR2 的表达与细胞周期的变化有关，DSCR2 在高度增殖的组织及细胞如胚胎组织、成年睾丸及肿瘤细胞系中的表达提示，DSCR2 的功能可能与细胞增殖有关[7]。

HSPC2 是在大规模文库筛选过程中从 $CD34^+$ 的造血干细胞中克隆得到的 300 多条基因之一，功能未知[8]。

CIB 是 1998 年研究人员用 integrin αIIb subunit 为诱饵通过酵母双杂交得到的一个新基因[9]，在小鼠组织如脑、肺、肾、肝等多种组织中广泛表达[10]。在近来的研究中又找到了一些 CIB 蛋白的其它相互作用因子，如 DNA-PKcs、Fnk 及 Snk、PS2、caspase-2S、NBR1 及 FEZ1 等[10]。CIB 与两个已知的钙调节蛋白 calcineurinB、calmodulin 有很高的同源性，它的活动可以受细胞内钙的调节[9]，它可以通过与上述不同蛋白因子的结合，在 DNA 损伤修复、细胞周期调节、细胞凋亡、神经系统早期发育、神经元的存活及可塑性、AD 的发生等方面发挥不同的作用。由此可见 CIB 可以作为一个重要的中间分子通过与不同蛋白的相互作用，在机体中执行多种功能。DAT1 很可能通过与 CIB 的结合而在神经系统发挥重要作用，因此 DAT1 与 CIB 的相互作用可以作为我们进一步研究的重点。

参考文献：

[1] Shi J, Cai W, Chen X, *et al*. Identification of dopamine responsive mRNAs in glial cells by suppression subtractive hybridization[J]. Brain Res, 2001, 910(1-2): 29 - 37.

[2] 惠　玲，蔡文琴，石　军，等. 神经特异性转录因子 DAT1mRNA 在大鼠中枢神经系统的定位[J]. 解剖学报，2004，3S(2)：122 - 125.

[3] Kenny D A, Jurata L W, Saga Y, *et al*. Identification and characterization of LMO4, an LMO gene with a novel pattern of expression during embryogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(19): 11257 - 11262.

[4] Sugihara T M, Bach I, Kioussi C, *et al*. Mouse DEAF-1 recruits a LIM domain factor, LMO-4, and CLIM coregulators[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(26): 15418 - 15423.

[5] Sum E Y, Peng B, Yu X, *et al*. The LIM domain protein LMO4 Interactors with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and Inhibits BRCA1 activity[J]. J Biol Chem, 2002, 277(10): 7849 - 7856.

[6] Vidal Taboada J M, Sanz S, Egeo A, *et al*. Identification and characterization of a new gene from human chromosome 21 between markers D21S343 and D21S268 encoding a leucine-rich protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 250(3): 547 - 554.

[7] Vidal-Taboada J M, Lu A, Pique M, *et al*. Down syndrome critical region gene 2: expression during mouse development and in human cell lines indicates a function related to cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 272(1): 156 - 163.

[8] Zhang Q H, Ye M, Wu X Y, *et al*. Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in $CD34^+$ hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Genome Res, 2000, 10(10): 1546 - 1560.

[9] Naik U P, Patel P M, Parise L V. Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain[J]. J Biol Chem, 1997, 272(8): 4651 - 4654.

[10] Whitehouse C, Chambers J, Howe K. NBR1 interacts with fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) and calcium and integrin binding protein (CIB) and shows developmentally restricted expression in the neural tube[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(2): 538 - 545.

（编辑　陈聪连）

（上接 409 页）

处的慢性损伤性炎症。肘关节长期劳损、过度伸腕、伸指和前臂旋转用力不当，致伸肌总腱起点反复受到牵拉刺激引起部分撕裂和慢性无菌性炎症，在肱骨外上髁尖部，肱骨外上髁与桡骨头之间产生肌筋膜炎，骨膜炎或肱桡关节滑膜炎，微血管神经束受卡压导致局部代谢障碍而出现疼痛、握物无力、手臂活动度受限等症状。

临床上治疗方法较多，疗效不一。我们主张以综合法治疗，促进血液循环，消炎、镇痛、松解粘连，使腕、肘关节的活动范围及相应的肌肉恢复正常状态。局部注射局麻药普鲁卡因和激素醋酸泼尼松龙封闭治疗可起到明显的消炎止痛效果。超声波的机械振动作用于人体引起微细按摩效应、温热效应，以及多种理化效应而使神经兴奋性降低，有较好的镇痛、解痉作用；加速局部组织血液循环，促进水肿消散；促进结缔组织分散，松解粘连[1]。因此对病程较长引起肌腱附着区变性、钙带钙化、骨质增生等的患者有明显疗效[2]。超声波透入组织的深度依于许多物理因子。其温热效应对促进局部血液循环、增强组织代谢、加速炎症产物和水肿的消散吸收、降低肌张力、解痉、止痛等作用明显。按摩可疏通经络，松解粘连，改善病患部位血液循环，使无菌性炎症消散，从而解除血管神经束的卡压，减轻和消除疼痛，促进关节活动功能恢复。

观察表明封闭、理疗、按摩结合运动疗法治疗本病，可充分发挥治疗因子间的相加与协同作用，疗效好，故综合法治疗网球肘，具有实际应用意义。

关键词：网球肘；康复治疗；封闭疗法；物理治疗；按摩
中图法分类号：R873　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 南登崑. 康复医学[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，2001：30.

[2] 裘法祖，孟承伟. 外科学[M]. 第4版. 北京：人民卫生出版社，1995：830.

[3] 南登崑. 康复医学[M]. 第3版. 北京：人民卫生出版社，2004：153.

[4] 曹建平，朱天一. 超短波及其不同物理因子治疗网球肘与效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志，2002，24(3)：186.

（编辑　江勃俭）