文章编号:1000-5404(2005)19-1935-04

论著

凋亡抑制蛋白Livin两种异构体真核表达载体的构建及表达鉴定

孙建国[1],陈正堂[1],王志新[1],张 青[2],廖荣霞[3] (第三军医大学:[1]新桥医院肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,[2]新桥医院核医学科,重庆 400037,[3]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建凋亡抑制蛋白Livin两种异构体(Livin α和β)真核细胞表达载体pcDNA3.1-Livin α和pcDNA3.1-Livin β。**方法** 利用分子克隆技术,首先设计合成扩增Livin基因异构体全长cDNA序列的特异性PCR引物,以肺腺癌SPC-A1细胞总RNA为模板,RT-PCR获得Livin基因异构体全长cDNA序列,TA克隆将Livin全长cDNA序列克隆到T载体上,用限制性内切酶*Hind*Ⅲ和*Xba* Ⅰ双酶切取所需目的片段,然后将该片段插入真核表达载体pcDNA3.1的多克隆位点,最后对产生的重组子进行双酶切、PCR鉴定,并经过测序证实后,构建成为Livin基因异构体表达载体(pcDNA3.1-Livin)。电穿孔法获得稳定表达Livin α和β的A549细胞克隆,Western blot验证Livin蛋白在转染细胞中的表达情况。**结果** 成功获得Livin α和Livin β全长cDNA序列,并克隆到真核表达载体pcDNA3.1上;基因转染后,阳性细胞分别表达Livin α和β。**结论** Livin基因两种异构体真核表达载体的构建及在细胞中的表达鉴定,为进一步研究Livin异构体功能及在肺癌细胞中的抗凋亡效应奠定了基础。

关键词:凋亡抑制蛋白;Livin;凋亡;真核表达载体
中图法分类号:Q51;Q782;Q786 **文献标识码**:A

Construction of eukaryotic expression vectors for Livin α and β

SUN Jian-guo[1], CHEN Zheng-tang[1], WANG Zhi-xin[1], ZHANG Qing[2], LIAO Rong-xia[3] ([1]Cancer Research Center, [2]Department of Nuclear Medicine, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression vectors for Livin α&β, two isoforms of a novel inhibitor of apoptosis protein family member. **Methods** Total RNA of SPC-A1 was extracted. The full-length cDNA of Livin isoforms was gained by RT-PCR, then inserted into T vector by T-A cloning. Positive recombinants were gained. Sequencing was performed to guarantee correct sequence insertion. The inserted sequence was subcloned into pcDNA3.1 to get expression vectors for the isoforms Livin α&β. A549 cell line was transfected with pcDNA3.1-Livin α & pcDNA3.1-Livin β respectively by electroporation. The positive clones were gained by G418-resistance screening. Western blotting was performed to assess the expression of Livin in transfected cells. **Results** Full-length cDNA of Livin α&β was cloned respectively and subcloned into pcDNA3.1 successfully. After gene transfection, Livin α&β were expressed respectively in positive cells. **Conclusion** The construction of eukaryotic expression vector for Livinα&β and validation of expression in cells provide basis for further research on functions of Livin α&β and their anti-apoptosis effect in lung cancer cell.

Key words: inhibitor of apoptosis protein family; Livin; apoptosis; eukaryotic expression vector

Livin是近年来发现的人类凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein family, IAP)家族的新成员,在胚胎组织中存在,而在除胎盘外的大多数终末分化组织中低表达或不表达[1~4]。研究表明,Livin在多数肿瘤中表达,如黑色素瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、膀胱癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、白血病以及淋巴瘤等[5~7]。Livin基因表达与肿瘤发生有密切关系,并可能作为诱导肿瘤凋亡治疗的新靶点。Livin存在两种异构体(isoform):Livin α和Livin β,前者cDNA全长897 bp,后者cDNA全长843 bp。两种异构体差异微小,仅后者外显子6缺失54 bp;然而二者不仅抗凋亡

基金项目:国家自然科学基金资助青年项目(30200282)
Supported by the Youth Program of the National Natural Science Foundation (30200282)

作者简介:孙建国(1972-),男,四川省资阳市人,博士,主治医师,主要从事肺癌生物治疗及小分子RNA调控机制方面的研究。电话:(023)68752672
通讯作者:陈正堂,电话:(023)68755626, E-mail: zhengtangchen@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-01-13;**修回日期**:2005-03-16

功能有差异，而且具有不同的组织表达谱，Livin α 而不是 Livin β，是早期浅表膀胱癌预后不良的标志，并且可作为膀胱癌复发的监测指标[6]，表明 Livin 在体内有复杂的作用机制。我们的研究表明，Livin 在 NSCLC 组织中表达，尤其是在肺腺癌患者中表达较高，不仅可作为肺腺癌的分子标志物，还有助于肺癌的诊断和组织分型。Livin 在放、化治疗后表达水平明显升高，阳性率达到43.5%，表明在化疗药物和放射线诱导癌细胞凋亡的同时，癌细胞合成表达抗凋亡的因子从而发生凋亡耐受，这可能是临床上肺腺癌发生耐药的机制之一[8]。然而，哪些化疗药物诱导 Livin 基因表达，Livin 基因在抗凋亡作用中的具体机制，以及两种异构体功能的差异等问题，有待进一步研究。本实验构建 Livin 异构体真核表达载体，为将来进行肺癌细胞基因转染，研究异构体不同的抗凋亡功能奠定基础，为探索肺癌细胞化疗耐药及放射性耐受机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和试剂

肺腺癌 A549 细胞株和 SPC-A1 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所，细胞用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养基，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。大肠杆菌 DH5α 和 JM109 及质粒 pcDNA3.1 为本科室保存；PCR 引物由大连 TaKaRa 生物有限公司合成；RT-PCR 试剂盒（TaKaRa RNA LA PCR™ Kit Ver.1.1）、pMD18-T vector 试剂盒、*E. coli* JM109 感受态细胞、细胞培养试剂购自 Hyclone 公司；T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ、核酸分子质量标准购自大连 TaKaRa 生物有限公司；RNA 提取试剂 Tripure 购自美国 Roche 公司；质粒抽提试剂盒、凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购自美国 Promega 公司；兔抗人 Livin 多克隆抗体为美国 Alpha Diagnostic International Inc. 产品，抗体工作浓度为 1∶1 000；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体为北京中山公司产品，工作浓度为 1∶1 000；羊抗人磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）多克隆抗体以及辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊抗体购自美国 Santa Cruz 生物公司。常规生物化学试剂购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 根据 GenBank 提供的 Livin（Livin α、Livin β）的 mRNA 序列，应用引物设计软件 Primer Premier 5.0 分别设计两对 Livin 特异性 PCR 扩增引物。第 1 对引物（Livin α-1、Livin β-1）用于扩增 Livin 全长 cDNA 序列，在 5′端分别添加 *Hind* Ⅲ（AAGCTT）和 *Xba* Ⅰ（TCTAGA）酶切位点及相应保护碱基序列。第 2 对引物（Livin α-2、Livin β-2）用于对重组载体进行 PCR 初步鉴定。序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab1 Sequence of primers for PCR

Primer	GenBank	Sense primer(P1)	Antisense primer(P2)	Length (bp)
Livin α-1	BC014475	5′-cgcaagcttatgggacctaaagacag-3′	5′-gctctagactaggacaggaaggtgcg-3′	914
Livin β-1	AF311388	5′-cgcaagcttatgggacctaaagacag-3′	5′-gctctagactaggacaggaaggtgcg-3′	860
Livin α-2	BC014475	5′-tgggacccgtgggaagaaccg-3′	5′-ccgcacggcacaaagacgatg-3′	275
Livin β-2	AF311388	5′-tgggacccgtgggaagaaccg-3′	5′-ccgcacggcacaaagacgatg-3′	221

1.2.2 Livin 基因异构体全长 cDNA 的获得（RT-PCR） 采用 Tripure 试剂一步法提取 SPC-A1 细胞总 RNA。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计测定纯度并定量。反转录：10 × RNA PCR buffer 2 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μl，10 mmol/L dNTP 2 μl，RNA 酶抑制剂 0.5 μl，AMV 反转录酶 1 μl，总 RNA 模板 1 μl（1 μg/μl），Oligo dT-Adaptor 引物 1 μl，RNase Free 三蒸水 8.5 μl。反应条件：30 ℃ 10 min，42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min。−20 ℃保存。PCR 扩增：10 × RNA PCR buffer 8 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 6 μl，TaKaRa LA *Taq* 0.5 μl，10 μmol/L P1 1 μl，10 μmol/L P2 1μl，三蒸水 63.5 μl，反转录产物 20 μl。反应条件：94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 30 s→60 ℃退火 45 s→72 ℃延伸 2 min，30 个循环，72 ℃延伸 7 min。

1.2.3 TA 克隆及重组质粒 pMD18-T-Livin 的构建和鉴定 采用 Promega 公司 Wizard PCR preps DNA purification system 试剂盒进行 PCR 产物纯化。紫外分光光度计测定纯化后的 PCR 产物纯度和浓度。TA 克隆：PCR 产物 1 μl，pMD18-T vector 1 μl，Solution Ⅰ 5 μl，三蒸水补足 10 μl，16 ℃连接过夜。将 5 μl 连接产物加入到 100 μl 的 *E. coli* JM109 感受态细胞中，冰上放置 30 min，42 ℃水浴 90 s，快速转移至冰上放置 2 min，加入 940 μl LB 培养基，37 ℃ 250 r/min 培养 1 h，收集菌体涂于含有氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基平板，放置 20 min 左右让培养基充分吸收菌液，37 ℃倒置培养过夜。按说明书进行阳性克隆质粒提取，分光光度计进行 DNA 定量。酶切鉴定和 PCR 鉴定：质粒 10 μl，10 × buffer 5 μl、*Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ限制性内切酶各 1 μl，无核酶三蒸水补足 50 μl，37 ℃双酶切 6 h，取反应产物 10 μl，2% 琼脂糖电泳。采用 Livin 异构体第 2 对引物进行 PCR 扩增，10 × PCR buffer 10 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 10 μl，TaKaRa *Taq* 0.5 μl，10 μmol/L P1 1 μl，10 μmol/L P2 1 μl，三蒸水 76.5 μl，重组质粒载体 1 μl。反应条件：94 ℃预变性2 min，94 ℃变性 30 s→56 ℃退火 30 s→72 ℃延伸 1 min，30 个循环，72 ℃延伸 7 min。4 ℃保存。分析正确的克隆进一步用 ABI 377 自动测序仪测序，测序引物为 M13R 和 M13F。获得阳性克隆 pMD18-T-Livin α 和 pMD18-T-Livin β。

1.2.4 亚克隆构建重组质粒 pcDNA3.1-Livin（pcDNA3.1-Livin α 和 pcDNA3.1-Livin β） pcDNA3.1 和 pMD18-T-Livin 质粒抽提，双酶切反应：质粒载体 10 μg，*Hind* Ⅲ 5 μl，*Xba* Ⅰ 5 μl，10 × Buffer 10 μl，三蒸水补足 100 μl。37 ℃水浴 6 h。按试剂盒说明书切胶回收线性化空载体和插入片段。取线性化载体 1 μl（约 100 ng），插入片段 4 μl（载体：片段摩尔数约为 1∶3），10 × T4 DNA 连接酶 buffer 2 μl，T4 DNA 连接酶 1 μl，加三蒸水补足 20 μl，16 ℃连接过夜。65 ℃10 min 灭活连接酶。细菌转化、酶切鉴定、PCR 鉴定方法同前。

1.2.5　pcDNA3.1-Livin 转染人肺腺癌 A549 细胞株　　参见文献[9]。电穿孔条件：电容 975 μF，电压 220 V，电阻无穷大，电穿孔杯 0.4 cm，电击时间 15～30 ms。同时设 pcDNA3.1 空载体转染阴性对照组。

1.2.6　Western blot 检测 Livin 异构体在转染细胞中的表达　参见文献[8]。

2　结果

2.1　pcDNA3.1-Livin 构建流程

结果见图 1。

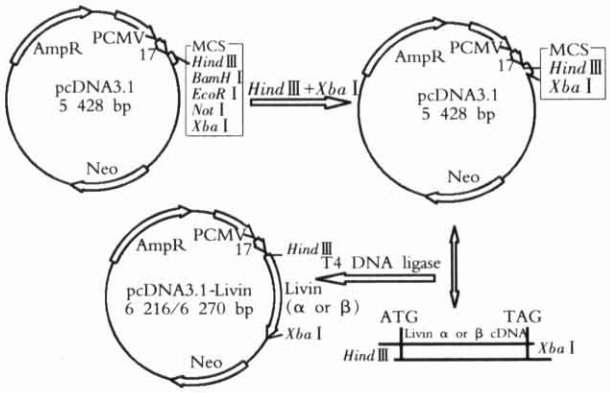
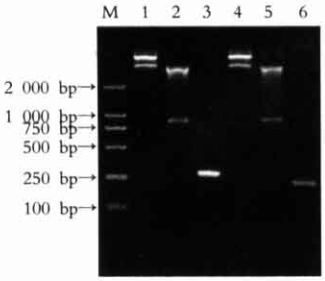


图 1　pcDNA3.1-Livin 真核表达载体构建流程图

Fig 1　Construction map of pcDNA3.1-Livin eukaryotic expression vector

2.2　重组载体酶切鉴定和 PCR 鉴定

pcDNA3.1-Livin α 重组子经 *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ双酶切后，2% 琼脂糖电泳呈两条带，其大小分别为 5.4 kb 的载体片段和 914 bp 的目的片段，PCR 扩增获得 275 bp 的产物；而 pcDNA3.1-Livin β 载体经 *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ双酶切后则出现 5.4 kb 的载体片段和 860 bp 的目的片段，PCR 扩增可获得 221 bp 的产物（图 2），说明被分别克隆到 pcDNA3.1 的 *Hind* Ⅲ和 *Xba* Ⅰ位点之间，成功构建 Livin 异构体真核表达载体。



M：DL2000 marker；1：pcDNA3.1-Livin α；2：pcDNA3.1-Livin α digested by *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ；3：pcDNA3.1-Livin α PCR amplification；4：pcDNA3.1-Livin β；5：pcDNA3.1-Livin β digested by *Hind* Ⅲ/*Xba* Ⅰ；6：pcDNA3.1-Livin β PCR amplification

图 2　pcDNA3.1-Livin 双酶切和 PCR 鉴定图谱

Fig 2　Electropherogram of pcDNA3.1-Livin by restriction endonuclease digestion and PCR amplification

2.3　重组载体的测序验证

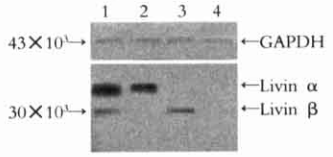
2.3.1　pcDNA3.1-Livin α 测序结果　　上海申能博彩生物有限公司测序（03050104 和 01050104），采用 M13R 和 M13F 双向测序。测序结果：碱基序列基本正确，只在第 528 位碱基（第 176 位密码子）发生同义突变 TCC→TCT（丝氨酸）。划线部分为外显子 6 中 54 bp 片段，在 Livin β 中缺失。

ATGGGACCTAAAGACAGTGCCAAGTGCCTGCACCGTGGACCA
CAGCCGAGCCACTGGCAGCCGGTGATGGTCCCACGCAGGAGC
GCTGTGGACCCCGCTCTCTGGGCAGCCCTGTCCTAGGCCTGGA
CACCTGCAGAGCCTGGGACCACGTGGATGGGCAGATCCTGGGC
CAGCTGCGGCCCCTGACAGAGGAGGAAGAGGAGGAGGGCGCC
GGGGCCACCTTGTCCAGGGGGCCTGCCTTCCCCGGCATGGGCT
CTGAGGAGTTGCGTCTGGCCTCCTTCTATGACTGGCCGCTGACT
GCTGAGGTGCCACCCGAGCTGCTGGCTGCTGCCGGCTTCTTCC
ACACAGGCCATCAGGACAAGGTGAGGTGCTTCTTCTGCTATGGG
GGCCTGCAGAGCTGGAAGCGCGGGGACGACCCCTGGACGGAG
CATGCCAAGTGGTTCCCCAGCTGTCAGTTCCTGCTCCGGTCAAA
AGGAAGAGACTTTGTCCACAGTGTGCAGGAGACTCACTCCCAGC
TGCTGGGCTCTTGGGACCCGTGGGAAGAACCGGAAGACGCAGC
CCCTGTGGCCCCCTCCGTCCCTGCCTCTGGGTACCCTGAGCTGC
CCACACCCAGGAGAGAGGTCCAGTCTGAAAGTGCCCAGGAGCC
AGGAGGGGTCAGTCCAGCCCAGGCCCAGAGGGCGTGGTGGGTTC
TTGAGCCCCCAGGAGCCAGGGATGTGGAGGCGCAGCTGCGGCG
GCTGCAGGAGGAGAGGACGTGCAAGGTGTGCCTGGACCGCGCC
GTGTCCATCGTCTTTGTGCCGTGCGGCCACCTGGTCTGTGCTGA
TGGTGCCCCCGGCCTGCAGCTGTGCCCCATCTGCAGAGCCCCC
GGTCCGCAGCCGCGTGCCACCTTCCTGTCCTAG

2.3.2　pcDNA3.1-Livin β 测序结果　　上海申能博彩生物有限公司测序（01050105 和 02050105），采用 M13R 和 M13F 双向测序。测序结果，碱基序列基本正确，同样，只在第 528 位碱基（第 176 位密码子）发生同义突变 TCC→TCT（丝氨酸）。在 Livin β 外显子 6 中缺失 54 bp 片段（序列略）。

2.4　pcDNA3.1-Livin 基因转染及 Livin 蛋白质在阳性细胞中的表达

转染前 A549 细胞呈单层生长，均匀分布，pcDNA3.1-Livin α、pcDNA3.1-Livin β 转染后 A549 细胞经 800 μg/ml G418 筛选约 3 周，形成稳定的细胞克隆，经有限稀释法获取单克隆扩增培养，分别获得稳定表达 Livin α 和 Livin β 的 A549 细胞。pcDNA3.1-Livin α、pcDNA3.1-Livin β 转染后 A549 细胞以及阳性对照 SPC-A1 细胞检测到 Livin 异构体的表达，而转染 pcDNA3.1 的 A549 细胞则不显影，表明 Livin α 和 Livin β 蛋白质在转染后 A549 细胞内表达（图 3）。



1：SPC-A1；2：A549/Livinα；3：A549/Livinβ；4：A549/pcDNA3.1

图 3　Western Blot 检测 Livin 蛋白表达

Fig 3　Protein detection of Livin by Western blotting

3 讨论

PCR 是一种快速、高效、大量获得目的片段的技术，并可以通过在上下游引物的 5′端引入不同的酶切位点而实现定向克隆。但对于获取 1 kb 甚至更长的目的片段时，可能有极个别碱基错误，这主要由于 PCR 扩增步骤中应用 *Taq* 酶可能造成的碱基错配，虽然高保真 DNA 聚合酶如 Vent、Pfu 酶等能最大限度地限制碱基错配的发生，但高保真酶扩增效率通常较低，并且获得的 PCR 产物往往产生平末端，不利于后续的 TA 克隆等工作。我们采用大连 TaKaRa 生物有限公司生产的 LA *Taq* 酶，专门用于长序列 PCR 产物的扩增，具有较高的保真性能，PCR 产物同样具有添加“A”碱基的特性，极大的方便了 TA 克隆等后续工作。测序结果表明，近 1 kb 的 Livin 两种异构体仅仅在第 528 位碱基（第 176 位密码子）发生突变，由于是同义突变（TCC→TCT 丝氨酸），不影响蛋白表达氨基酸序列。关于同义突变的原因，由于两个克隆来自同一次 PCR 反应，经两个方向 4 次测序获得相同变异序列，可以排除是测序误差所致，很可能与 PCR 过程中发生碱基错配有关，但也可能与基因的单核苷酸多态性有关，因为 GenBank 中收录的 Livin 序列是西方人种中克隆到的，而本实验是从 SPC-A1 细胞株中克隆的，这是一株来源于中国人的肺癌细胞株，因人种的差异而发生个别碱基不一致是常见现象。由于确定单核酸多态性需要进行更深入复杂的实验，如 PCR 单链构象多态性分析法（PCR-SSCP）等，与本课题后续实验无直接联系，故本研究未给予进一步证实。在分子克隆中，发生同义突变的报道很多见[10,11]，一般情况同义突变并不影响蛋白表达及蛋白的空间结构。因此，用 LA *Taq* 酶获取诸如 Livin 异构体全长 cDNA 片段这样的长片段 PCR 产物是成功的。

哺乳动物细胞表达载体 pcDNA3.1 可用于外源基因在哺乳动物细胞系（如 CHO）中表达，该表达载体属新霉素抗性选择系统，带有细菌的新霉素抗性基因 Neo，在 SV40 启动子驱动下可在真核细胞中表达，其编码产物为氨基糖苷磷酸转移酶（APH），能使新霉素类似物 G418（Geneticin）失活，故用 G418 筛选可获得导入有表达载体的阳性细胞克隆；在 pcDNA3.1 质粒的多克隆位点上游有 1 个 PCMV 启动子，插入到多克隆位点的外源基因在该启动子驱动下可得以有效表达。

实验结果表明，我们成功地扩增了凋亡抑制蛋白 Livin 两种异构体（Livin α 和 β）全长 cDNA 目的片段，插入真核表达载体 pcDNA3.1 的多克隆位点上，成功构建了 Livin α 和 β 的真核细胞表达载体，对于研究其在对抗化疗药物或放射线作用下细胞生长的变化，探讨 Livin α 和 β 在抗肺癌细胞凋亡中的不同生物学功能，为进一步探讨其作为诱导肺癌细胞凋亡治疗分子靶点的可能性提供实验依据。

（致谢：本研究在第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所，创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室完成，粟永萍教授为本工作提供了极大帮助，在此表示衷心感谢！）

参考文献：

[1] Lin J H, Deng G, Huang Q, *et al*. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279 (3): 820 - 831.

[2] Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (5): 3238 - 3246.

[3] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, *et al*. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J]. FEBS Lett, 2001, 495 (1 - 2): 56 - 60.

[4] Vucic D, Stennicke H R, Pisabarro M T, *et al*. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas [J]. Curr Biol, 2000, 10(21): 1359 - 1366.

[5] Yagihashi A, Asanuma K, Tsuji N, *et al*. Detection of anti-livin antibody in gastrointestinal cancer patients[J]. Clin Chem, 2003, 49 (7): 1206 - 1208.

[6] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, *et al*. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer[J]. Ann Oncol, 2003, 14(1): 85 - 90.

[7] Crnkovic Mertens I, Hoppe Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. Oncogene, 2003, 22(51): 8330 - 8336.

[8] 孙建国，廖荣霞，陈正堂，等. 一种新的凋亡抑制蛋白 Livin 在非小细胞肺癌组织中的表达[J]. 重庆医学, 2004, 33(7): 982 - 984.

[9] 孙建国，廖荣霞，陈正堂，等. 小鼠肝脏特异的微 RNA 在 HeLa 细胞中的转染与表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(3): 196 - 199.

[10] 张 革，柯细松，冯 涛，等. 血管发生抑制因子 restin 的克隆表达及其抗血管活性的初步研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(3): 194 - 197.

[11] 何祥梁，郭先健，黄桂君. HSV_1-TK 基因转导人肺腺癌细胞 A549 体内外表达的研究[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(5): 375 - 377.

（编辑 汪勤俭）