文章编号:1000-5404(2009)12-1123-04

论著

人脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 hAPE1 融合蛋白的构建、纯化及其功能的初步研究

戴 楠,王 东,李梦侠,曹晓静,曾林立,廖 玲,杨宇馨 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

摘 要:目的 构建人脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(hAEP1)原核表达载体,在大肠杆菌中表达并纯化融合蛋白,对其活性进行初步分析。**方法** 用PCR法扩增hAEP1基因,克隆入pET28a载体中,获得重组质粒pET28a-hAPE1。将重组质粒转化入*E. coli* BL21(DE3),IPTG诱导表达并鉴定。用His亲和层析技术进行蛋白纯化,得到hAPE1融合蛋白。用Western blot及电泳迁移率变动分析实验分析hAPE1融合蛋白的抗原性及活性。**结果** 所构建的重组质粒pET28-hAPE1经双酶切及DNA测序鉴定表明构建正确。IPTG诱导表达后,经SDS-PAGE及Western blot鉴定均在预期位置出现阳性条带,His亲和层析纯化后得到hAPE1融合蛋白经SDS-PAGE及Western blot鉴定正确。Western blot及电泳迁移率变动分析实验证明hAPE1融合蛋白具有抗原性、AP修复及氧化还原活性。**结论** 成功构建了人脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶的原核表达载体pET28a-hAPE1,并在*E. coli BL*21(DE3)中高效表达和纯化得到有抗原性及活性的hAPE1融合蛋白。

关键词: 人脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶;原核表达;蛋白纯化;结构与功能
中图法分类号: Q503;Q513;Q556.5 **文献标识码:** A

Construction, purification and functional characterization of hAPE1 fusion protein

DAI Nan, WANG Dong, LI Meng-xia, CAO Xiao-jing, ZENG Lin-li, LIAO Ling, YANG Yu-xin (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct a prokaryotic expression vector for human apurinic/apyrimidinic endonuclease (hAPE1) genes, to purify its fusion protein, and to study its activity. **Methods** PCR-amplified hAPE1 gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET28a for recombinant plasmid pET28a-hAPE1. Then this recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced to express hAPE1 fusion protein with IPTG. The expressed hAPE1 fusion protein was identified by SDS-PAGE and Western blot, and purified by affinity chromatography with His column. Immunogenicity and activity of hAPE1 fusion protein were analyzed by Western blot and EMSA. **Results** DNA sequencing, SDS-PAGE, and Western blot showed pET28a-hAPE1 was constructed correctly. High expression of hAPE1 fusion protein by pET28a-hAPE1 was found in *E. coli* BL21 (DE3). The hAPE1 fusion protein, being of immunogenicity, AP repair, and redox function, could be purified via affinity chromatography with His column. **Conclusion** The prokaryotic expression vector of pET28a-hAPE1 vector was successfully constructed. The hAPE1 fusion protein could be highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and successfully purified, which is significant for the elucidation of the biological characters of APE1 and the preparation of antibodies in the future study.

Key words: human apurinic/apyrimidinic endonuclease; prokaryotic expression; protein purification; structure and function

脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(Apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox effector factor, APE1/Ref-1)是BER通路中的重要成员,是哺乳动物细胞中主要的AP核酸内切酶,具有修复AP位点和氧化还原双重功能,与细胞凋亡、肿瘤发生及神经系统退行性变化有着密切的关系[1]。近年来,国内外的研究表明,APE1还与肿瘤的放、化疗抵抗密切相关[2,3]。为了深入研究人脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(hAPE1)的生物功能及其与放

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30670628)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30670628)
作者简介: 戴 楠,女,山西省运城市人,硕士研究生,主要从事肿瘤DNA损伤修复及基因治疗方面的研究。电话:(023)68757169, E-mail: dn030315@hotmail.com
通信作者: 王 东,电话:(023)68757151, E-mail: dongwang64@hotmail.com
收稿日期: 2009-04-28;**修回日期:** 2009-05-05

化疗抵抗的相关性,本研究构建了含 hAPE1 全长基因的原核表达载体 pET28-hAPE1,成功纯化了 hAPE1 融合蛋白,并对 hAPE1 融合蛋白的抗原性及活性进行了初步分析,为进一步研究 hAPE1 蛋白的生物学功能及制备 hAPE1 抗体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

大肠杆菌 *E. coli* DH5α 和 BL21(DE3)感受态细胞、HaLa 细胞、pcDNA3.1-hAPE1 载体、重组腺病毒 Ad5/F35-siAPE1[4] 由本室保存;pET28a 载体由本校医学检验系临床微生物学教研室王海光硕士惠赠;Eppin-His 融合蛋白由本校医学检验系临床生化教研室惠赠;DMEM 培养基、小牛血清购自 Gibco 公司;限制性内切酶 *Nco*Ⅰ和 *Bam*HⅠ、Primer star DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;Poly(dI-dC)购自 Sigma 公司;ECL 检测试剂盒、HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体、HRP 标记 His 抗体购自 Pierce 公司;[γ-^{32}P]ATP 购自北京福瑞生物工程公司;尿嘧啶糖基化酶(UDG)购自美国 NEB 公司;小鼠抗人 APE1 单克隆抗体购自 Novus 公司;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒为 Geneaid 公司产品;引物合成及测序由上海英骏生物工程公司完成;HiTrap chelating HP、Sephadex G-25 购自 Pharmacia 公司,纯化设备由重庆富进生物医药有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及核蛋白提取 HeLa 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 37 ℃、5% CO_2 条件下培养传代。d5/F35-siAPE1 以 4 MOI 感染 HaLa 细胞 2 h 后换液,继续正常培养 48 h 后收集细胞提取核蛋白。

核蛋白的提取:0.25% 胰酶消化 HaLa 细胞,收集 1×10^7 细胞离心后 PBS 洗涤 3 次,以 500 μl 预冷缓冲液 A(10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, pH 7.9)重悬,冰浴 10 min,离心收集沉淀以 500 μl 预冷缓冲液 B(10 mmol/L HEPES, 0.1 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, pH 7.9)重悬,冰浴 20 min 后离心取上清测定蛋白浓度,于 -70 ℃保存或立即使用。

1.2.2 hAPE1 基因的扩增 根据 GenBank 中 hAPE1 基因序列设计引物,上游引物:5′-CATGCCATGGCTCCGAAGCGTGG-GAA-3′(含 *Nco*Ⅰ酶切位点);下游引物:5′-GCGGATCCTCAAT-GATGATGATGATGATGATGATGATGCAGTGCTAGGTATAGG-3′(含 *Bam*HⅠ酶切位点和 10×His),产物长度 1 007 bp。以含 hAPE1 全长基因序列的 pcDNA3.1-hAPE1 载体为模板进行 PCR 反应。反应条件:98 ℃预变性 2 min;95 ℃ 12 s, 62 ℃ 15 s,72 ℃ 1 min,10 个循环;98 ℃ 12 s, 55 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后胶回收。

1.2.3 pET28a-hAPE1 原核载体的构建及鉴定 将 PCR 产物及 pET28a 质粒用 *Nco*Ⅰ和 *Bam*HⅠ双酶切,以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。胶回收大小约为 982 bp 和 5 260 bp 片段,按 5∶3(载体片段∶目的片段)混合后用 T_4 DNA 连接酶于 16 ℃ 连接过夜,再转化入 *E. coli* DH5α 中。随机挑取阳性克隆扩增,提取质粒后用 *Nco*Ⅰ和 *Bam*HⅠ双酶切,电泳鉴定正确后测序。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达、可溶性分析 将鉴定正确的 pET28a-hAPE1 克隆转化入 *E. coli* BL21(DE3)中,再接种在含 K^+ 的 LB 培养液中培养过夜,次日按 1∶100 转接,37 ℃培养至 *D*(600)为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG,继续培养 4 h。取诱导 4 h 菌液 5 ml,离心后加入裂菌液(0.1 mg/L 溶菌酶,5 mmol/L EDTA)重悬,冰浴超声破菌,4 ℃离心分离上清和沉淀,将沉淀用 8 mol/L 尿素重悬。以诱导前菌液为对照,将诱导后菌液、上清、沉淀行 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色鉴定融合蛋白的表达形式。

1.2.5 hAPE1 融合蛋白的纯化[5]及鉴定 按上述条件诱导融合蛋白大量表达。离心收集菌体,用上样缓冲液(20 mmol/L PBS,pH 9.0)重悬,冰浴超声破菌,4 ℃离心收集上清后过滤备用。用上样缓冲液平衡 His 柱,取待纯化样品上样,再用上样缓冲液流洗至基线,分别用 50 mmol/L 和 200 mmol/L 咪唑洗脱,收集蛋白峰。将纯化的蛋白行 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色分析结果。

将电泳结果正确的蛋白溶液 4 ℃透析过夜,取样行 12% SDS-PAGE 电泳,分 A、B 2 组电转移到 PVDF 膜上,A 组以 HaLa 细胞核蛋白为阳性对照,B 组用 Eppin-His 融合蛋白(含 6×His)为阳性对照,HaLa 细胞核蛋白为阴性对照。用 1% 的 BSA 37 ℃封闭 2 h,A 组一抗用小鼠抗人 APE1 单抗(1∶20 000)4 ℃孵育过夜,二抗用 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 单抗(1∶4 000)37 ℃ 孵育 40 min;B 组用 HRP 标记的 His 抗体(1∶4 000)37 ℃孵育 1 h,采用发光蛋白免疫印迹法对 2 组进行显影分析。

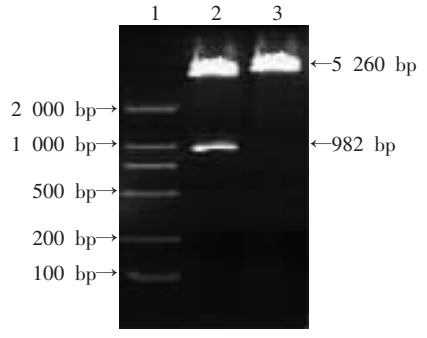
1.2.6 hAPE1 融合蛋白氧化还原活性检测 采用电泳迁移率变动分析实验(electrophoretic mobility shift assay,EMSA):参照文献[6],人工合成 NF-κB 探针序列如下:P1:5′-AGCT-TAGAGGGGACTTTCCGAGAGGA-3′, P2:5′-TCCTCTCGGAAAG-TCCCCTCTAAGCT-3′,其中包含 NF-κB 转录因子的识别序列。参照文献[4],用同位素[γ-^{32}P]ATP 标记 NF-κB 寡核苷酸探针,并用 Sephadex G-25 离心层析柱纯化。NF-κB 与探针的反应体系(20 μl)为:4×结合缓冲液、1 μg/μl poly(dI-dC),2 μg hAPE1 融合蛋白,以正常 HaLa 细胞核蛋白(4 μg)及感染 Ad5/F35-siAPE1 的 HaLa 细胞核蛋白(4 μg)为对照。混匀后冰浴 15 min,加入标记的探针 2 μl,室温反应 20 min 后,将混合物行 5% PAGE 恒压 100 V 电泳 2 h,将凝胶放入暗盒压 X 线片,密封后在 -70 ℃ 曝光 24 h,分析显影结果。

1.2.7 hAPE1 融合蛋白 AP 修复活性检测 参照文献[7],设计模拟 AP 位点的 42 mer 寡核苷酸正义链和反义链,序列为:正义链 22-U:5′-CCGCTGAATTGCACCCTCGAUCTAGGTCG-ATGATCCTAAGCA-3′,反义链 22-C:5′-TGCTTAGGATCATCGA-CCTAGGTCGAGGGTGCAATTCAGCGG-3′,其中 U 代表尿嘧啶,在 UDG 作用下可形成 AP 位点,被 APE1 识别 22-U 的 5′端标记生物素,APE1 蛋白结合反应(20 μl)体系为:10 mmol/L HEPES(pH 7.4),0.1 mol/L KCl,hAPE1 融合蛋白(0.2、2 μg),以 4 μg HaLa 细胞核蛋白做阳性对照,2 μg BSA 做阴性对照,2 pmol/L 探针,37 ℃反应 30 min。加甲酰胺终止反应,将混合物行 10% PAGE(含 7 mol/L 尿素)恒压 150 V 电泳 50 min 后步骤同 EMSA。

2　结果

2.1　pET28a-hAPE1 载体的构建

通过降落 PCR 扩增 hAPE1 重组基因,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 1 007 bp 左右的片段,与预期大小相符。pET28a-hAPE1 载体经 *Nco* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切后,得到 2 条约为 1 000 bp 和 6 000 bp 的片段,与预期的结果相符(图 1)。测序结果与 hAPE1 在 GenBank 中登录的碱基序列完全一致,表明原核表达载体构建成功。

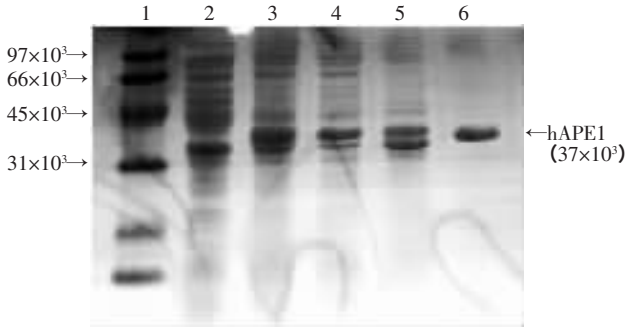


1: DNA 标准(DL2000);2: pET28a-hAPE1 经 *Nco* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切;3:pET28a-hAPE1

图 1　pET28a-hAPE1 的双酶切鉴定结果

2.2　hAPE1 融合蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化

经 IPTG 诱导表达后,取细菌悬液行 12% SDS-PAGE 鉴定,可见在相对分子质量约 37×10^3 处有目的蛋白条带,蛋白含量约占菌体蛋白的 50%,可溶性和包含体表达同时存在。选择破菌后的上清,通过 His 亲和层析技术纯化得到 hAPE1 融合蛋白(图 2)。



1: 低分子量蛋白标准;2: pET28a-hAPE1 未诱导;3: IPTG 诱导 pET28a-hAPE1 4 h 后;4:IPTG 诱导 pET28a-hAPE1 4 h 破菌后上清;5:IPTG 诱导 pET28a-hAPE1 4 h 破菌后沉淀;6:纯化后 hAPE1 蛋白

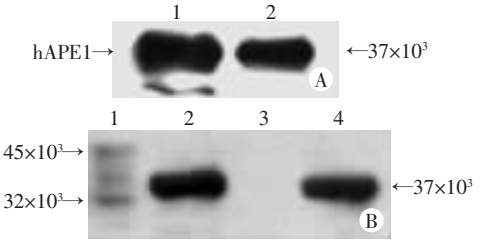
图 2　pET28a-hAPE1 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 中的表达及纯化结果

2.3　hAPE1 融合蛋白的 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示,经 hAPE1 抗体和 His 抗体孵育的融合蛋白在相对分子质量 37×10^3 处出现特异性反应条带,与预期相符(图 3),表明 pET28a-hAPE1 成功表达 hAPE1 融合蛋白,该重组蛋白具有良好的免疫反应性。

2.4　hAPE1 融合蛋白活性分析

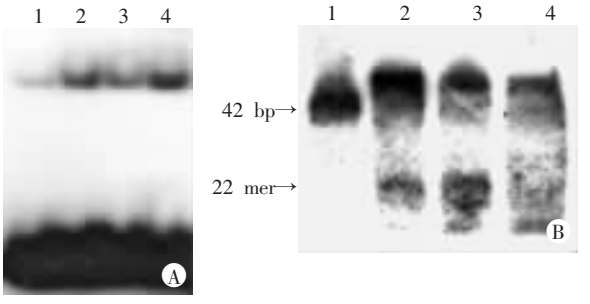
EMSA 结果显示,正常 HaLa 细胞核蛋白可与 NF-κB 探针结合;当加入 hAPE1 融合蛋白后,与 NF-κB 探针的结合明显增加;当感染重组腺病毒 Ad5/F35-siAPE1 后,与 NF-κB 探针的结合明显减少;而当感染 Ad5/F35-siAPE1 后再加入 hAPE1 融合蛋白,与 NF-κB 探针的结合又显著增多。说明 hAPE1 可以增加 Hala 细胞核蛋白与 NF-κB 转录因子序列的结合,具有氧化还原活性(图 4A)。



A:一抗为抗人 APE1 单克隆抗体(Novuse)　1:纯化后的 hAPE1 蛋白;2:HaLa 细胞核蛋白;B:抗体为 HRP-His 抗体(Pierce)　1:低分子量蛋白标准; 2:纯化后的 hAPE1 蛋白;3:Hala 细胞核蛋白;4:Eppin-His 融合蛋白(含 6×His)

图 3　纯化的 pET28a-hAPE1 融合蛋白的 Western blot 结果

AP 修复活性实验显示,hAPE1 融合蛋白可以参与反应切下 22 mer 的产物,并且随着加入的蛋白量的增加,切下的产物量明显增加。提示 hAPE1 融合蛋白具有 AP 修复活性(图 4B)。



A: hAPE1 融合蛋白氧化还原活性检测　1:感染 Ad5/F35-siAPE1 的 Hala 细胞核蛋白;2:正常 Hala 细胞核蛋白;3:感染 Ad5/F35-siAPE1 的 Hala 细胞核蛋白中加入 hAPE1 融合蛋白后;4:正常 Hala 细胞核蛋白加入 hAPE1 融合蛋白后;B:hAPE1 融合蛋白修复活性检测　1:BSA 阴性对照;2:0.2 μg APE1 融合蛋白;3:2 μg APE1 融合蛋白;4:Hala 细胞核蛋白阳性对照

图 4　hAPE1 融合蛋白活性检测结果

3　讨论

APE1/Ref-1 是哺乳动物细胞主要的 AP 核酸内切酶,是 BER 通路中关键的限速酶。其蛋白的空间结构主要由 N 端和 C 端 2 个有所重叠的功能域构成,N 端包含核定位序列和氧化还原调控区,C 端为 DNA 修复内切酶活性区。正是这种双重结构使 APE1/Ref-1 具有多种生物功能:它能够与 OGG1、XRCC1、PCNA、FEN1、polymerase β 等蛋白质相互作用,激活 BER 通路[8]修复烷化和氧化引起的 DNA 损伤;能够发挥 3′-磷酸二酯酶和 3′-5′核酸外切酶活性,分别在修复辐射引起的 DNA 损伤[9]和切除 DNA 脱氧核糖核苷类似物[10]中发挥重要作用;同时,APE1/Ref-1 还可以作为氧化还原因子调节转录因子的活性,激活包括 AP-1(Fos/Jun)、NF-κB、HIF-1α,CREB、p53 等多种转录因

子的转录活性,进而影响肿瘤的发展及进程[11]。目前的研究普遍认为,APE1/Ref-1 的修复与氧化调节功能与肿瘤细胞放、化疗的敏感性有关[12,13],一旦缺少了 DNA 修复能力,肿瘤细胞可进入凋亡;而缺少对转录因子的调节,会导致转录因子的 DNA 结合能力缺失,阻止肿瘤细胞生长信号的传播,进而阻止肿瘤细胞的血管发生及生长[11]。APE1/Ref-1 各种功能的相互协调作用是一个复杂的过程,其分子机制尚未阐明,是目前国内外研究的热点之一。

为了同时研究 hAPE1 的修复功能和氧化还原功能及其抗原性,本研究构建了 pET28a-hAPE1 原核表达载体并纯化出有活性的 hAPE1 融合蛋白。pET28a-hAPE1 载体的 hAPE1 基因测序结果与 GenBank 中 hAPE1 基因序列行 BLAST 比对同源性达 100%,并以正确的阅读框插入 pET28a 中。在 37 ℃加入 IPTG 0.4 mmol/L 诱导时,pET28a-hAPE1 可在 *E. coli* BL21(DE3)中高表达,蛋白含量约占菌体蛋白的 50%。带有的 10×His 是为亲和纯化所设计,较 6×His 更能增加 His 柱对目的蛋白的亲和力,在蛋白纯化中有利于杂蛋白的洗脱。本研究中,我们同时用人 APE1 抗体和 His 抗体对融合蛋白行 Western blot 检测,均得到阳性结果,证明 pET28a-hAPE1 原核表达载体成功表达了 hAPE1 融合蛋白,并具有良好的免疫反应性。蛋白活性实验结果显示该融合蛋白不但能够识别 UDG 作用生成的 AP 位点并行使切除修复功能,而且能够与 NF-κB 结合,说明融合蛋白同时具有 AP 修复和氧化还原活性,这为我们进一步研究 hAPE1 蛋白的双重生物学功能,为后续制备 hAPE1 抗体奠定了物质基础。

本实验室在前期构建 hAPE1 原核表达载体的预实验中,曾构建得到带肠激酶(EK)位点和 GTST 标签的 pZT42-hAPE1 原核表达载体,但在随后的纯化和酶切时发现融合蛋白容易发生变性,其 N 端可逐渐降解。而本研究构建的 pET28a-hAPE1 载体,诱导和纯化条件简单,纯化后 hAPE1 融合蛋白性质比较稳定。2 者的不同之处在于:pET42a-hAPE1 是将 hAPE1 的 C 端连接 EK 位点和 GST 标签并在纯化后切去 GST 标签;而 pET28a-hAPE1 是将 hAPE1 的 C 端连接 10×His,并不将其切除。我们分析并猜测其原因可能为:①连接 GST 标签后由于分子量变大,hAPE1 蛋白的空间结构受到影响,易发生氨基酸链断裂;②hAPE1 在体外环境下可能性质不稳定;③His 标签可能增加了 hAPE1 在体外的稳定性[14]。由于 10×His 标签相对分子质量很小,pH 为 8,不会对蛋白的表达、分泌、折叠、构象和特性产生显著影响,比较容易得到和天然蛋白相似的产物,且 10×His 的免疫原性差,不用切去融合蛋白也可直接作为抗原。因此对 hAPE1 的蛋白活性、生物学功能的研究和制备抗体产生干扰的机会也很小。

(致谢:感谢重庆富进生物医药有限公司的技术支持及向德兵博士、张云嵩博士、卿毅博士、张沁宏硕士的帮助!)

参考文献:

[1] Evans A R, Limp-Foster M, Kelley M R. Going APE over ref-1 [J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83-108.

[2] Fishel M L, Kelley M R. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target [J]. Mol Aspects Med, 2007, 28(3-4): 375-395.

[3] Bapat A, Fishel M L, Kelley M R. Going Ape as an approach to cancer therapeutics [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(3): 651-668.

[4] Xiang D B, Chen Z T, Wang D, *et al*. Chimeric adenoviral vector Ad5/F35-mediated APE1 siRNA enhances sensitivity of human colorectal cancer cells to radiotherapy in vitro and *in vivo*[J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(10): 625-635.

[5] 陆 健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 29-50.

[6] Zhang L, Torgerson T R, Liu X Y, *et al*. Preparation of functionally active cell-permeable peptides by single-step ligation of two peptide modules[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(16): 9184-9489.

[7] Wong H K, Muftuoglu M, Beck G, *et al*. Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(12): 4103-4113.

[8] Fan J, Wilson D M 3rd. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38(9): 1121-1138.

[9] Parsons J L, Dianova I I, Dianov G L. Ape1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(12): 3531-3536.

[10] Chou K M, Cheng Y C. An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3′ mispaired DNA[J]. Nature, 2002, 415(6872): 655-659.

[11] Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, *et al*. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 11(3): 601-620.

[12] Wang D, Luo M H, Kelley M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679-686.

[13] Wang D, Zhong Z Y, Li M X, *et al*. Vector-based Ape1 small interfering RNA enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to endostatin *in vivo*[J]. Cancer Sci, 2007, 98(12): 1993-2001.

[14] Frimpong K, Darnay B G, Rodwell V W. Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase expressed in Escherichia coli: production of homogeneous protein[J]. Protein Expr Purif, 1993, 4(4): 337-344.

(编辑 吴培红)