论著

文章编号:1000-5404(2010)19-2080-05

真核表达载体 pEGFP-N1-hSyntenin 的构建及其在人脑胶质瘤细胞 CHG-5 中的表达

钟 东[1],唐文渊[1],冉建华[2],杨 刚[1],晏 怡[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经外科[1],基础医学院解剖学教研室[2])

【摘要】 目的 构建 pEGFP-N1-hSyntenin 基因真核表达载体,并观察其在人脑胶质瘤细胞 CHG-5 中的表达。方法 采用 RT-PCR 技术从人脑肿瘤组织中扩增 hSyntenin,并将 PCR 产物双酶切后定向克隆入 pEGFP-N1 的多克隆位点,构建 pEGFP-N1-hSyntenin 重组质粒。经过菌落 PCR、双酶切及测序验证后,采用脂质体转染技术将 pEGFP-N1-hSyntenin 融合基因转染 CHG-5 细胞表达,G418 筛选建立稳定表达 hSyntenin 的 CHG-hS 细胞系。采用荧光检测和免疫印迹技术分析 hSyntenin 在稳定转染的 CHG-5 细胞系中的表达。结果 菌落 PCR 鉴定出 1 个阳性克隆,阳性克隆经双酶切鉴定得到分别与载体和目的片段大小一致的 4.7 kb 和 897 bp 的两条片段,测序证实目的基因 hSyntenin 正确连接到 pEGFP-N1 的多克隆位点;pEGFP-N1-hSyntenin 重组体稳定转染 CHG-5 细胞后,细胞荧光检测结果显示 hSyntenin 在 CHG-5 细胞质发出绿色荧光,免疫印迹检测可见 32×10^3 处的阳性条带。结论 成功构建 pEGFP-N1-hSyntenin 重组质粒,并在人脑胶质瘤细胞 CHG-5 中获得稳定表达。

【关键词】 pEGFP-N1-hSyntenin;稳定转染;CHG-5
【中图法分类号】 R394-33;R394.2;R739.41 【文献标志码】 A

Construction of eukaryotic expression vector pEGFP-N1-hSyntenin and its expression in CHG-5 cells

Zhong Dong[1], Tang Wenyuan[1], Ran Jianhua[2], Yang Gang[1], Yan Yi[1] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, [2]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To construct the enhanced green fluorescent protein (EGFP)-labeled eukaryotic expression recombinant vector of human syntenin (hSyntenin) gene, and observe its expression in CHG-5 cells. Methods hSyntenin was amplified from human glioma by RT-PCR. The PCR products were cloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-N1 after *Xho* Ⅰ and *Bam*H Ⅰ digestion. Recombinant plasmid pEGFP-N1-hSyntenin was identified by PCR, double enzyme digestion and DNA sequencing, and transfected into CHG-5 cells with Lipofectamine 2000. After screened with G418, a stably transfected CHG-5 cell line was established. Expression of hSyntenin in CHG-5 cells was identified by immunocytochemistry and immunoblot analysis, respectively. Results A positive clone was identified by PCR. The fragments were 4.7 kb and 897 bp in length, which were consistent with the carrier and purpose gene respectively by double enzyme digestion. The eukaryotic expression plasmid of pEGFP-N1-hSyntenin was confirmed by DNA sequencing and its stable transfectant into CHG-5 cell line was established. Fluorescence image revealed that the hSyntenin with green fluorescence was expressed in cytoplasm of CHG-5 cells. Immunoblot following SDS-PAGE showed the positive band at 32×10^3. Conclusion Recombinant eukaryotic expression vector of pEGFP-N1-hSyntenin, constructed in this study, is stab1y expressed in CHG-5 cell line.

【Key words】 pEGFP-N1-hSyntenin; stable transfection; CHG-5

Corresponding author: Tang Wenyuan, Tel: 86-23-89012161, E-mail: Twy621@126.com

Syntenin 是从人黑色素瘤细胞中克隆出来的一种支架蛋白,其可通过特殊的 PDZ 结构域与上下游信号分子相互作用,调控相应的细胞病理生理过程和信号转导途径,从而在肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移过程中发挥着重要的作用[1,2]。目前已在黑色素瘤,转移性乳腺癌和消化道肿瘤、胶质母细胞瘤等多种恶性肿瘤

【通信作者】 唐文渊,电话:(023)89012161,E-mail:Twy621@126.com

中发现 Syntenin 过度表达,并认为其表达水平与肿瘤的恶性程度和进展密切相关[3-6],但对其促进肿瘤细胞迁移和侵袭相关分子机制的研究并不充分。本研究构建 pEGFP-N1-hSyntenin 基因真核表达载体并将其转入胶质瘤细胞 CHG-5 中,旨在为深入研究 Syntenin 促进胶质瘤转移的分子机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

RNA 抽提试剂购自美国 Omega 公司,cDNA 第 1 链合成试剂盒、高保真 PCR 扩增酶、限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ、质粒抽提试剂盒、胶回收及 PCR 纯化试剂盒、DNA 连接试剂盒均购自大连宝生物工程公司,PCR 扩增引物由上海生物工程服务公司合成,pEGFP-N1 载体购自美国 Clontech 公司,Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,G418 购自美国 Sigma 公司,RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品,感受态细菌 JM109 为本实验室留存,人脑胶质瘤细胞 CHG-5 由第三军医大学西南医院病理学研究所馈赠,兔抗大鼠 Syntenin 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 的 SDCBP 序列和 pEGFP-N1 载体上的多克隆位点,用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,上游引物 5′-ATTCTCGAGATGTCTCTCTATCCATCTCTCG-3′(划线处为 *Xho* Ⅰ 的酶切位点),下游引物 5′-ATTGGATCCCTCAACCTCAGGAATGGTGTGGTC-3′(划线处为 *Bam*H Ⅰ 的酶切位点),预计扩增长度为 897 bp。分别在上游和下游引物的 5′端加上了 *Xho* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切位点及保护性碱基。

1.2.2 RT-PCR 扩增 按照 Omega 公司 RNA 抽提试剂盒说明书提供的方法抽提人脑胶质瘤组织总 RNA,参照上海宝生物工程公司 cDNA 第 1 链合成试剂盒说明书进行 cDNA 合成。20 μl PCR 反应总体积中加入下列物质:DEPC 处理水12.0 μl,PCR 高保真酶反应缓冲液 2 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.8 μl,10 mmol/L dNTP 混合物 1.8 μl,10 pmol/μl 的上下游引物各 0.6 μl,高保真酶 0.2 μl,cDNA 模板 1.0 μl。在 9700 型 PCR 扩增仪(GeneAmp PCR System 9700,美国应用生物系统公司 ABI)上完成 PCR 扩增,设置循环参数如下:先 94 ℃预变性 3 min 后,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 50 s,完成 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,置 4 ℃保温。取 2 μl PCR 扩增产物,1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增结果。

1.2.3 pEGFP-N1-hSyntenin 重组质粒的构建与鉴定 将 hSyntenin 扩增的 PCR 产物和 pEGFP-N1 载体在 37 ℃用 *Xho* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切 2 h,50 μl 双酶切反应体系如下:hSyntenin 扩增产物 30 μl、反应缓冲液 5 μl、*Bam*H Ⅰ 2 μl、*Xho* Ⅰ 2 μl 及灭菌蒸馏水 11 μl。hSyntenin 酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化后,连接到已用 *Xho* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切好的 pEGFP-N1 载体上,在连接酶的作用下 16 ℃连接过夜,10 μl 反应体系为:hSyntenin 双酶切片段 5 μl,pEGFP-N1 双酶切载体 3 μl,连接酶 1 μl 和连接缓冲液 1 μl。然后将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 JM109。培养过夜后挑取克隆,在含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中增菌,取适量菌液煮沸后离心以上清液为模板,按照 1.2.2 PCR 扩增条件对所挑选克隆进行菌落 PCR 鉴定,其中设置的阴性对照模板为去离子水,阳性对照模板为 hSyntenin cDNA。对菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆提取质粒做双酶切鉴定。将重组质粒送检进行 DNA 测序,先对两个连接点处进行测序,在证实连接成功后,对插入的目的基因全长进行双向测序。

1.2.4 建立稳定转染 hSyntenin 的 CHG-5 细胞系 CHG-5 细胞在含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 ℃、50 ml/L CO_2 培养箱中培养,待细胞融合至 80% ~ 90% 时,按照 Lipofectamine 2000 操作说明书将 pEGFP-N1 和重组表达载体 pEGFP-N1-hSyntenin 转染 CHG-5 细胞,在 37 ℃,5% 的 CO_2 中保温 6 h 后,更换为新鲜 RPMI1640 培养基培养,每间隔 24 h,在荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达情况。转染 3 d 后,用胰蛋白酶消化细胞,采用有限稀释法将细胞种入 96 孔板中,每孔加入含有 G418 (1000 mg/L) 的选择性培养基 200 μl 继续培养。持续筛选 3 周后,获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆,扩增培养即得到稳定表达 hSyntenin 的 CHG-5 细胞系。细胞转染 24 h 后,倒置荧光显微镜下可见小部分细胞发出绿色荧光。转染 72 h 后,表达绿色荧光的细胞达到 40% 左右。使用 G418 筛选后,细胞大量死亡,幸存细胞生长缓慢;2 周后,阴性细胞逐渐减少,阳性表达细胞持续增加,经有限稀释法筛选荧光较强的细胞加压筛选并克隆化后,获得稳定表达 10 代以上的高表达细胞株,将稳定转染 pEGFP-N1-hSyntenin 及空载体 pEGFP-N1 的 CHG-5 细胞株分别命名为 CHG-hS 和 CHG-P。

1.2.5 细胞荧光观察稳定转染后 CHG-5 细胞系中 hSyntenin 的定位 分别将持续传代的抗 G418 的 hSyntenin 的 CHG-5 细胞系、转染空载体组的 CHG-5 细胞系和 CHG-5 细胞系(阴性对照)接种于直径 12 mm 的盖玻片上。待细胞融合至 80% ~ 90%,将细胞玻片按以下程序检测:PBS 漂洗 5 min,4 % 多聚甲醛固定 15 min;PBS 漂洗 3 次后,用 4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)对细胞核进行复染,PBS 漂洗 3 次后用 50 % 甘油封片,荧光显微镜下观察照相。采用倒置荧光显微镜,在 488 nm 波长下观察 CHG-hS、CHG-P 和 CHG-5 细胞中绿色荧光的分布,同时 DAPI 为紫外光(UV)激发,发射蓝光染细胞核。

1.2.6 免疫印迹检测转染后 CHG-5 细胞系中 hSyntenin 的表达

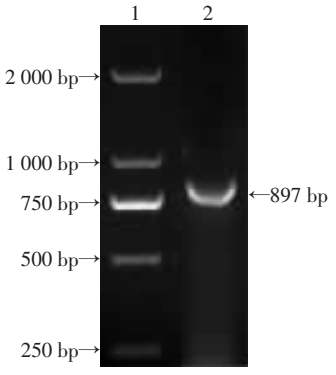
将约 2×10^6 个 CHG-5、CHG-hS 和 CHG-P 细胞常规消化离心,用冷 PBS 洗涤 3 次,加入 1 ml 预冷的裂解缓冲液[0.1 mol/L NaCl,0.01 mol/L Tris.Cl (pH 7.6),1 mmol/L EDTA (pH 8.0),1 μg/ml Aprotinin,100 μg/ml 79 PMSF],用粗枪头吹打数次,混匀后冰浴 30 min,超声裂解 30 s;将细胞裂解液移入一预冷的 1.5 ml 离心管中,12 000 × *g*,4 ℃离心 30 min,转移上清于一新离心管中,取上清并测定蛋白浓度。将备好的样品按 50 μg 蛋白/道上样于 10% SDS-PAGE gels (Invitrogen),加入电泳缓冲液,120 mV,2.5 h;按常规电转移步骤将蛋白转至 PVDF 膜;经 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h 后,用 5% BSA/TBST 缓冲液稀释的

hSyntenin 多克隆抗体(稀释度为 1∶1500)和 β-actin 抗体(稀释度为 1∶1000)孵育 2 h;TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,用 5% 的脱脂牛奶/TBST 缓冲液稀释的二抗(浓度为 1∶10 000)孵育 1 h;TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,增强型化学发光液(ECL)避光孵育 15 min 后,用保鲜膜完全包裹免疫印迹膜,去除皱褶。用胶带将免疫印迹膜固定在暗盒内,蛋白带面向上,暗房内压 X 线片,曝光、显影、冲洗。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 hSyntenin

hSyntenin 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析,得到的基因片段大小为 897 bp,与预期片段一致(图 1)。

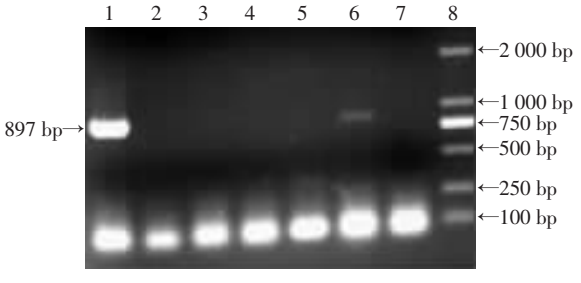


1∶DNA 标准(DL 2000);2∶hSyntenin 基因片段

图 1 hSyntenin 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

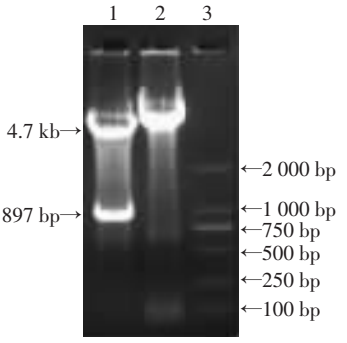
2.2 重组质粒阳性菌落 PCR、pEGFP-N1-hSyntenin 的双酶切鉴定及测序

以菌液为模板,按照 1.2.2 PCR 扩增条件对所挑选克隆进行菌落 PCR 鉴定,电泳结果显示 1 个克隆扩增出 897 bp 大小的目的片段(图 2),对菌落 PCR 克隆为阳性的克隆提取质粒做双酶切鉴定,电泳后得到大小约为 4.7 kb 和 897 bp 的两条片段,大条带与载体大小一致,小条带与目的片段大小一致,表明目的片段已插入 pEGFP-N1(图 3)。以 pEGFP-N1-hSyntenin 质粒载体多克隆位点上的通用引物进行双向测序鉴定,发现重组质粒插入片段的序列与 GenBank 登录的序列一致,证明成功构建 pEGFP-N1-hSyntenin 载体。



1-5∶随机挑选的克隆;6∶阳性对照;7∶阴性对照;8∶DNA 标准(DL 2000)

图 2 重组质粒菌落 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定



1∶*Xho* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 pEGFP-N1-hSyntenin;2∶*Xho* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 pEGFP-N1;3∶DNA 标准(DL 2000)

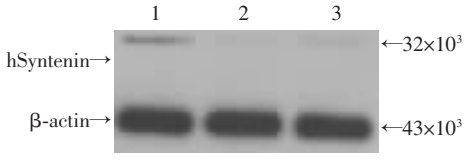
图 3 重组质粒 pEGFP-N1-hSyntenin 双酶切鉴定

2.3 稳定转染后 CHG-5 细胞系的荧光观察

CHG-hS 和 CHG-P 细胞质中可见绿色荧光分布,而细胞核未见绿色荧光。DAPI 的蓝色荧光布满细胞核,EGFP 产生的绿色荧光分布在 DAPI 蓝色荧光的周围,细胞核区域没有颜色的叠加,而 CHG-5 细胞质观察到蓝色荧光布满细胞核,未见绿色荧光,提示 pEGFP-N1-hSyntenin 融合蛋白主要表达于细胞质,而在细胞核没有表达(图 4)。

2.4 稳定转染后 CHG-5 细胞系的免疫印迹鉴定

在稳定转染 hSyntenin 的 CHG-hS 细胞中可检测到相对分子质量 32×10^3 的条带,而空载体转染的 CHG-P 细胞和平行对照的 CHG-5 细胞中相应条带很弱,证实稳定转染 hSyntenin 的 CHG-5 细胞系构建成功(图 5)。

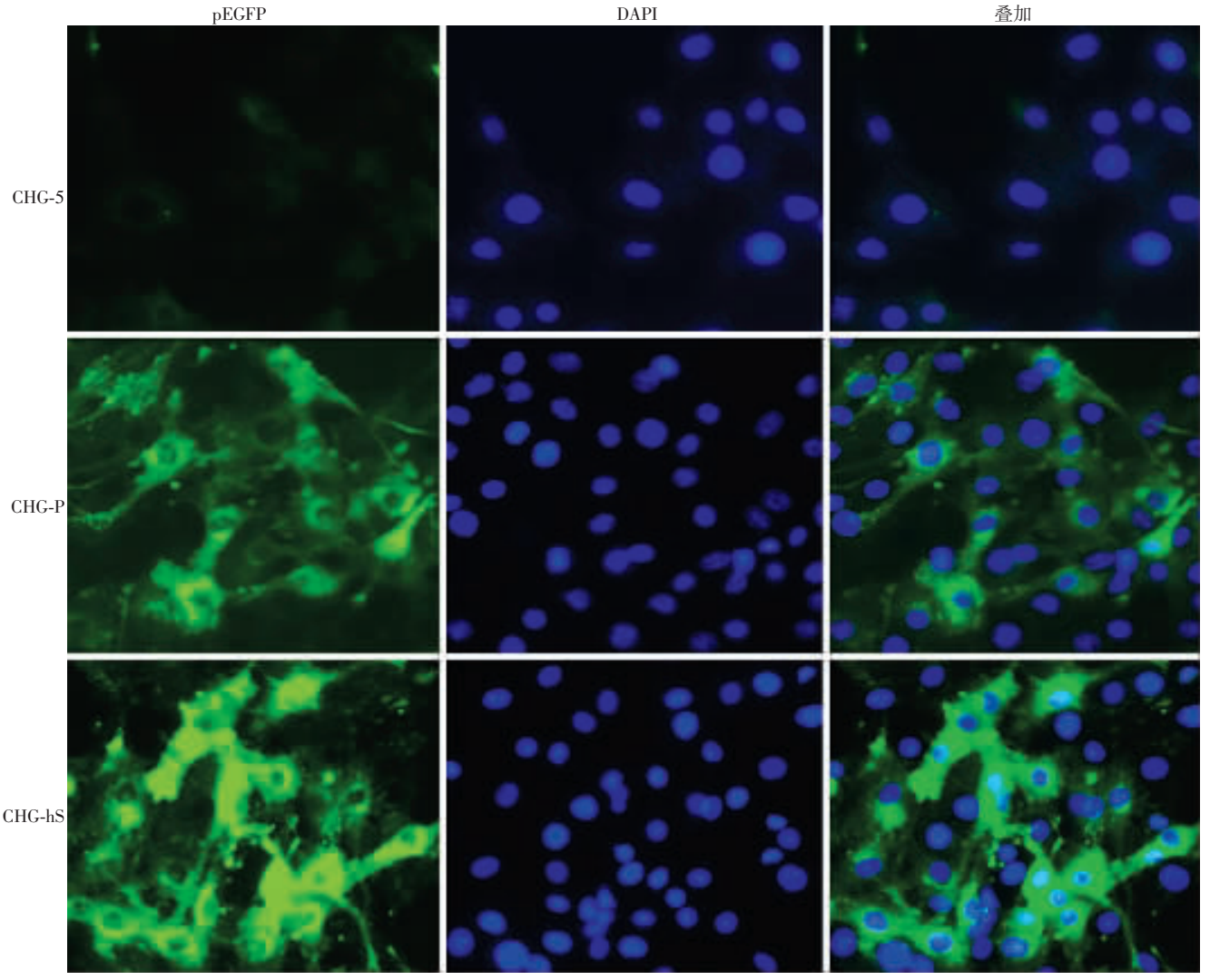


1∶转染 pEGFP-N1-hSyntenin;2∶转染空载体 pEGFP-N1;3∶未转染

图 5 免疫印迹法检测 CHG-5 细胞系融合蛋白 EGFP-hSyntenin

3 讨论

Syntenin 是黑色素瘤分化相关因子,在不同种类的生物中广泛存在并具有高度的种属同源性[1,2]。主要分布于上皮细胞来源的细胞连接处以及成纤维细胞的黏着斑和应力纤维中;过表达的 Syntenin 在多种类型细胞中具有诱导包括皱褶、片状伪足、指状突起以及神经突样结构等质膜结构形成的功能,在细胞迁移的过程中发挥重要作用[7,8]。研究发现,过表达 Syntenin 可诱导低转移性黑色素瘤细胞产生更多的肌动蛋白应力纤维和黏着斑,而表达反义 Syntenin 的高转移性黑色素瘤细胞中肌动蛋白微丝和黏着斑的形成减少;并且 Syntenin 表达引起的细胞骨架组成和形态的改变



CHG-5:未转染的 CHG-5 细胞;CHG-P:转染空载体 pEGFP-N1 的 CHG-5 细胞;CHG-hS:转染 pEGFP-N1-hSyntenin 的 CHG-5 细胞

图 4 转染细胞荧光显微镜观察 (×400)

与黏着斑激酶(FAK)相关;免疫荧光共聚焦研究显示,WM1341D 黑色素瘤细胞中 Syntenin 与磷酸化的 FAK 共表达,免疫共沉淀证实了二者之间具有相互作用;Syntenin 通过触发 FAK 的磷酸化作用增加肿瘤细胞的迁移和侵袭能力[9-11]。目前已在包括黑色素瘤,转移性乳腺癌和消化道肿瘤等多种恶性肿瘤中发现 Syntenin 过度表达,并认为其表达水平与肿瘤的恶性程度和进展密切相关[3-5],但对其促进肿瘤细胞迁移和侵袭相关分子机制的研究并不充分。本课题组新近研究发现,Syntenin 基因和蛋白的表达水平上调与脑胶质瘤组织的发生、发展有密切关系,也与 FAK Tyr397 的磷酸化水平相关,胶质瘤细胞中 Syntenin 可能通过与 FAK 相互作用并由相应的信号转导途径调控细胞骨架重组、收缩、黏着斑解聚与形成等过程,增加胶质瘤细胞运动和侵袭能力[6];但这一推测还需要从分子和细胞水平进行验证,而构建表达 Syntenin 的真核表达载体并将其转入胶质瘤细胞中可为深入研究 Syntenin 促进胶质瘤转移的分子机制提供可靠的实验基础。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)作为荧光指示剂已经在生物研究中被广泛使用,pEGFP 是一种经碱基修饰和人源化改造成功的优化突变型。携带有 EGFP 蛋白表达基因的 pEGFP-N1 载体具有以下几方面特点:①从结构上看,该质粒具有很强的复制能力,可以满足随宿主细胞分裂时跟随细胞质遗传给新生的子细胞,这是保证目的基因稳定表达的因素之一;②含有高效的功能强大的启动子 SV40 和 PCMV,可以使目的基因在增殖的细胞中稳定表达;③具有多克隆位点,便于目的基因的插入;④该载体具有 neo 基因,可以采用 G418 来筛选已成功转染了该载体的靶

细胞；⑤其产生的荧光较普通 GFP 强 35 倍，增强了其报告基因的敏感度，降低了细胞毒性和种系依赖性，对目的基因的功能也没有影响；并且 pEGFP 的 N 及 C 端均可与其他蛋白融合而不影响其发光。以上特殊的结构可以实现目的基因在靶细胞内的稳定表达，从而使之成为一种受研究者青睐的通用报告基因[12,13]。

CHG-5 细胞是第三军医大学病理学研究所自行培养、克隆并建株的人脑胶质瘤细胞系[14-17]。CHG-5 细胞形态以圆形核为主，梭形细胞少见，免疫组化结果示胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）强阳性，S-100 蛋白阳性，表明其为星形胶质细胞源性肿瘤，且细胞分化程度较高。本课题前期研究结果显示，Syntenin 在该细胞系中表达为弱阳性，因此，外源性引入 Syntenin 基因使其在 CHG-5 细胞中过度表达可为研究 Syntenin 促进胶质瘤细胞恶性发展提供良好的细胞模型。

基于以上特点，本项研究选用 pEGFP-N1 作为真核表达载体，利用基因工程技术构建 pEGFP-N1-hSyntenin 融合蛋白的哺乳动物表达载体，对菌落 PCR 克隆为阳性的克隆提取质粒做双酶切克隆，电泳后得到大小约为 4.7 kb 和 897 bp 的两条片段，表明目的片段已插入 pEGFP-N1，然后送检进行 DNA 双向测序，发现序列准确无误，证明成功构建 pEGFP-N1-hSyntenin 载体。采用脂质体转染法将 pEGFP-N1-hSyntenin 融合基因转染 CHG-5 细胞中进行表达，经过 G418 稳定筛选阳性克隆 CHG-hS。在 488 nm 波长的倒置荧光显微镜下观察到 CHG-hS 细胞质中可见绿色荧光分布，而细胞核没有呈现绿色荧光，提示 pEGFP-N1-hSyntenin 融合蛋白主要表达于细胞质，而在细胞核没有表达。细胞免疫印迹检测发现，在稳定转染 hSyntenin 的 CHG-hS 细胞中可检测到相对分子质量为 32×10^3 的条带，而空载体转染的 CHG-P 细胞和平行对照的 CHG 细胞中相应条带很弱，证实了稳定转染 hSyntenin 的 CHG-5 细胞系构建成功，从而为 Syntenin 功能及信号机制等后续研究奠定基础。

参考文献：

[1] Sarkar D, Boukerche H, Su Z Z, *et al*. mda-9/syntenin: recent insights into a novel cell signaling and metastasis-associated gene[J]. Pharmacol Ther, 2004, 104(2): 101-115.

[2] Pineau P, Marchio A, Nagamori S, *et al*. Homozygous deletion scanning in hepatobiliary tumor cell lines reveals alternative pathways for liver carcinogenesis[J]. Hepatology, 2003, 37(4): 852-861.

[3] Lin J J, Jiang H, Fisher P B. Characterization of a novel melanoma differentiation-associated gene, mda-9, that is down-regulated during terminal cell differentiation[J]. Mol Cell Differ, 1996, 4(4): 317-333.

[4] Jiang H, Fisher P B. Use of a sensitive and efficient subtraction hybridization protocol for the identification of genes differentially regulated during the induction of differentiation in human melanoma cells[J]. Mol Cell Differ, 1993, 1(3): 285-299.

[5] Lin J J, Jiang H, Fisher P B. Melanoma differentiation associated gene-9, mda-9, is a human gamma interferon responsive gene[J]. Gene, 1998, 207(2): 105-110.

[6] 钟东，唐文渊，吴海涛，等. Syntenin 在人脑胶质瘤中的表达及其临床意义[J]. 第三军医大学学报，2010，32(6)：597-600.

[7] Zimmermann P, Tomatis D, Rosas M, *et al*. Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(2): 339-350.

[8] Sulka B, Lortat-Jacob H, Terreux R, *et al*. Tyrosine dephosphorylation of the syndecan-1 PDZ binding domain regulates syntenin-1 recruitment[J]. J Biol Chem, 2009, 284(16): 10659-10671.

[9] Boukerche H, Su Z Z, Emdad L, *et al*. mda-9/Syntenin: a positive regulator of melanoma metastasis[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10901-10911.

[10] Boukerche H, Su Z Z, Prévot C, *et al*. mda-9/Syntenin promotes metastasis in human melanoma cells by activating c-Src[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(41): 15914-15919.

[11] Seya T, Shime H, Ebihara T, *et al*. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy[J]. Cancer Sci, 2010, 101(2): 313-320.

[12] Glinka E M, Andryushchenko A S, Sapozhnikov A M, *et al*. Construction of the plasmid for expression of ETA-EGFP fusion protein under control of the cytomegalovirus promoter and its effects in HeLa cells[J]. Plasmid, 2009, 62(2): 119-127.

[13] Morris M C. Fluorescent biosensors of intracellular targets from genetically encoded reporters to modular polypeptide probes[J]. Cell Biochem Biophys, 2010, 56(1): 19-37.

[14] 陈自强，卞修武，辛榕，等. 人脑胶质瘤细胞系 CHG-5 的建立及其生物学特性的分析[J]. 第三军医大学学报，1999，21(12)：880-883.

[15] 姚声涛，黄轶，曾昭淳，等. 细胞死亡调控基因 GRIM19 重组腺病毒的构建及在恶性胶质瘤 CHG-5 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报，2008，30(23)：2194-2197.

[16] 姚声涛，陈佳琳，黄轶，等. 腺病毒介导 GRIM19 对恶性胶质瘤 CHG-5 细胞增殖及分化的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(6)：548-551.

[17] 董俊清，赵妍妍，姚琦，等. 青蒿琥酯增加人脑胶质瘤细胞 CHG-5 对 β 射线的敏感性[J]. 第三军医大学学报，2010，32(6)：588-592.

（收稿 2010-05-17 修回 2010-06-17）

（编辑 王 红）