技术方法

文章编号:1000-5404(2011)02-0210-04

bcl-x 选择性剪接微基因报告方法的建立

黄 波[1],王小中[1],王彩纹[1],李 静[2],章海斌[1],熊火梅[1],肖 芸[1],余 佳[3] (330006 南昌,南昌大学:第二附属医院检验科[1],第一附属医院检验科[2];IL 60611, Chicago, USA, Department of Dermatology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University[3])

【摘要】 目的 利用 bcl-x 微基因(minigene)构建重要顺式作用元件 B2G、CRCE2 的突变微基因,建立 bcl-x 微基因报告法并应用于 bcl-x 选择性剪接机制的研究。**方法** 以构建成功的 pcDNA3.1(-)-bcl-x 微基因为模板,利用反向 PCR 的方法,按碱基互补配对原则设计能让顺式元件 B2G, CRCE2 定点突变的引物,进行 PCR 反应。PCR 反应结束后,用 *Dpn* Ⅰ对模板质粒 DNA 进行消化,然后使 PCR 产物发生自身环化反应。将环化产物转化入感受态 DH5α,通过筛选并最后利用测序来鉴定所构建突变微基因成功与否。**结果** 测序结果鉴定,所克隆的突变微基因序列碱基无一错误突变。并且在 HL-60 细胞中,RT-PCR 实验表明 bcl-x 顺式作用元件 B2G,CRCE2 对 bcl-xL/bcl-xS 有一定影响,pcDNA3.1(-)-bcl-x-B2G(M)转染后 RT-PCR 电泳显示 bcl-xS 几乎消失,pcDNA3.1(-)-bcl-x-CRCE2(M)转染后 RT-PCR 电泳显示 bcl-xL/bcl-xS 为 1.6。**结论** 成功构建及应用人类凋亡相关基因 bcl-x 的突变微基因,顺式作用元件 B2G 缺失使 bcl-xS 几乎消失,CRCE2 突变使 bcl-xL/bcl-xS 上升。

【关键词】 微基因报告;微基因;突变微基因;bcl-xL/bcl-xS;选择性剪接

【中图法分类号】 R394-33 **【文献标志码】** B

细胞凋亡过程中常常会发现相关基因发生选择性剪接(alternative splicing),产生功能明显不同甚至相互拮抗的蛋白异构体[1]。凋亡调控基因 bcl-x 前 mRNA 通过选择性剪接主要产生 2 种 mRNA,分别编码一长(Bcl-xL)一短(Bcl-xS)2 种蛋白质,Bcl-xL 具有抗凋亡作用,而 Bcl-xS 具有促凋亡作用[2]。bcl-x 选择性剪接异常导致 bcl-xL/bcl-xS 值的增高与肿瘤的发生密切相关。在肿瘤细胞中,蛋白异构体 Bcl-xL 常常是主要形式,并且其过量表达可导致对化疗药物的抵抗[3],而蛋白异构体 Bcl-xS 过量表达可增加对化疗药物的敏感性[4],但 Bcl-xL/Bcl-xS 值如何发生异常,目前没有确切的机制。本研究利用 bcl-x 微基因并应用该微基因报告法来探索肿瘤细胞中发生 bcl-x 选择性剪接异常的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒和菌株:质粒 pcDNA3.1(-)购自上海捷瑞生物工程有限公司,感受态细胞 *E. coli* DH5α 购自北京全式金生物技术有限公司。主要试剂:2×*Taq* PCR Marster Mix、细胞基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自天根生化(北京)科技有限公司,氨苄青霉素购自美国 Amersco 公司,限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司,KOD-Plus 突变试剂盒购自东洋纺(上海)生物科技有限公司,Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas(加拿大)公司。

1.2 方法

1.2.1 bcl-x 微基因的构建 ①目的片段的扩增:利用 PCR 方法首先扩增出 bcl-x 基因中外显子 2 的 3′部分序列(包括 xS 和 xL 选择性位点)及内含子 2 的 5′部分序列,其中上下游引物分别为 P1:5′-AGATAtctagaATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTG-3′;P2:5′-TAGATctcgagCAATCACCCAACACAACAGAAAGAG-3′,划线部分为酶切位点前加的保护碱基,小写分别为 *Xba* Ⅰ、*Xho* Ⅰ酶切位点。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,59 ℃ 45 s,72 ℃ 50 s,35 次循环;72 ℃ 7 min;然后 PCR 再扩增出 bcl-x 基因内含子 2 的 3′部分序列及外显子 3 的 5′部分序列,其中上下游引物分别为 P3:5′-ATAGCgaattcCACAGTCATGCCCGT-CAGGAACCAG-3′;P4:5′-TAGATctcgagCCACCCACCTACATCA-CTCTCTGAG-3′。划线部分为酶切位点前加的保护碱基,小写部分分别为 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ酶切位点。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,60 ℃ 50 s,72 ℃ 50 s;72 ℃ 7 min。引物均为上海捷瑞生物工程有限公司合成。②bcl-x 基因片段的定向克隆及鉴定:将琼脂糖凝胶回收后的 PCR 产物 P1P2 用 *Xba* Ⅰ及 *Xho* Ⅰ双酶切,同时用 *Xba* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切真核表达质粒 pcDNA3.1(-),将酶切后的 P1P2 及 pcDNA3.1(-)行 T_4 连接酶反应,连接产物为 pcDNA3.1(-)-P1P2,经转化反应,筛选阳性克隆及质粒提取,然后用 *Xba* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切鉴定后送上海捷瑞生物工程有限公司测序。另外利用 *Xho* Ⅰ及 *Eco*R Ⅰ双酶切琼脂糖凝胶回收后的 PCR 产物 P3P4 及鉴定无误的质粒 pcDNA3.1(-)-P1P2,将酶切后的 P3P4 及 pcDNA3.1(-)-P1P2 行 T_4 连接酶反应,连接产物为 pcDNA3.1(-)-P1P2-P3P4,其中 P3P4 片段位于 P1P2 片段下游,P1P2-P3P4 即 bcl-x 基因片段。

1.2.2 突变微基因 pcDNA3.1(-)-bcl-x-B2G(M) pcDNA3.1(-)-bcl-x-CRCE2(M)的构建及鉴定 按照 KOD-Plus 突变试剂盒要求并参见 Massiello 等[5-6] 的构建突变序列设计引物,突变(CRCE2)1:5′-gaattcGCACGTTAGCGGGGCACTGTGCGTG-GAAAGCGTA-3′、突变(CRCE2)2:5′-CCACAATGCGACCCCAG-TTTACCCCATCCCGGAAGAGTTCA-3′;缺失(B2G)1:5′-CGCAT-TGTGGCCTTTTTCTCCTTCG-3′、缺失(B2G)2:5′-ATTCACTAC-CTGTTCAAAGCTCTGA-3′。引物均由上海捷瑞生物工程有限公

【基金项目】 国家自然科学基金(30700338)

【通信作者】 王小中,电话:(0791)6300410,E-mail:wangxzlj@126.com

司合成。小写部分为 *Eco*RⅠ酶切位点，包含在突变序列之内，便于酶切鉴定构建是否成功。其构建策略见图 1。用含氨苄青霉素的平板筛选阳性菌落，将菌落增菌后提取质粒，酶切鉴定后送上海捷瑞生物工程有限公司测序。

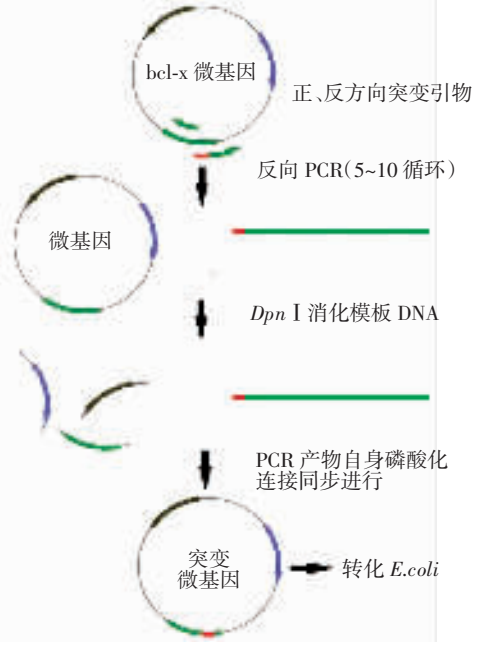


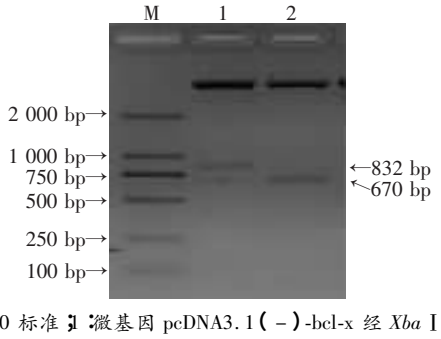
图 1　反向 PCR 法构建突变微基因策略

1.2.3　微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x 及其突变微基因在 HL-60 中的表达及鉴定　　参照 Lipofectamine2000 使用说明，用 pcDNA3.1(－)-bcl-x 微基因及其突变微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M)，pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 瞬时转染 HL-60 细胞，转染 48 h 后，进行总 RNA 提取，根据 pcDNA3.1(－)-bcl-x 微基因的序列设计特异性引物 P5 5′-AAACGGGCCCTCTAGAATGT-3′，P6 5′-GAATCACCAAACACAACAG-3′，使用 RT-PCR 方法鉴定 bcl-x 基因的表达情况。

2　结果

2.1　bcl-x 微基因的构建

构建成功的微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x 经 *Xba*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶切得到 832 bp 片段，经 *Xba*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ双酶切得到 670 bp 片段，均与预期的片段相符，测序结果也证实序列正确无误(图 2)。

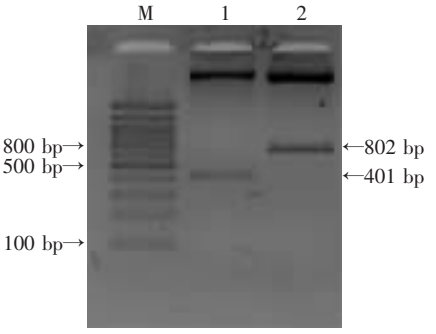


M：DL2000 标准；1：微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x 经 *Xba*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶切；2：微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x 经 *Xba*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ双酶切

图 2　微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x 酶切鉴定电泳

2.2　突变微基因的鉴定

2.2.1　突变微基因双酶切鉴定　　突变微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 经 *Eco*RⅠ单酶切和 pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M) 经 *Xba*Ⅰ、*Eco*RⅠ双酶切后均得到预期片段(图 3)，测序结果正确。



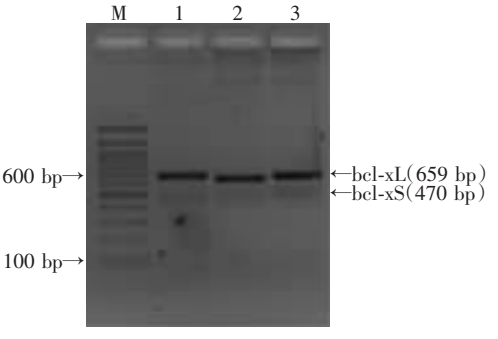
M：100 bp Plus Ⅱ DNA Ladder；1：pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 经 *Eco*RⅠ单酶切；2：pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M) 经 *Xba*Ⅰ、*Eco*RⅠ双酶切

图 3　突变微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M)、pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 酶切鉴定电泳

2.2.2　突变微基因的测序鉴定　　将构建好的突变微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M)、pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 送往上海捷瑞生物工程有限公司测序，发现成功将微基因 pcDNA3.1(－)-bcl-x 中 B2G 序列 GAACTCTTCCGGGATGGGGTAAACTGGGGT 缺失掉；CRCE2 正常序列 CCTTTTTCTCCTTCG 已经成功突变为 CRCE2 突变序列 GAATTCGCACGTTA，无一错误突变。

2.3　RT-PCR 鉴定微基因在细胞中的表达

pcDNA3.1(－)-bcl-x、pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M)、pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 在 HL-60 细胞中表达，用 P5 和 P6 引物扩增出目的条带 bcl-xL 和 bcl-xS(图 4)。应用 Bio-Rad 公司的图像分析软件 Quantity One 对条带进行分析发现 pcDNA3.1(－)-bcl-x 转染后 RT-PCR 电泳 bcl-xL/bcl-xS 为 1.4；pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M) 转染后 RT-PCR 电泳后 bcl-xS 几乎消失；pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 转染后 RT-PCR 电泳 bcl-xL/bcl-xS 为 1.6。



M：100 bp Plus Ⅱ DNA Ladder；1：pcDNA3.1(－)-bcl-x 转染后；2：pcDNA3.1(－)-bcl-x-B2G(M) 转染后；3：pcDNA3.1(－)-bcl-x-CRCE2(M) 转染后

图 4　微基因及其突变微基因转染后 RT-PCR 电泳

3 讨论

随着人类基因组计划的完成及其后续分析,学者发现选择性剪接过程在产生蛋白组多样性方面具有重要作用,并且选择性剪接可控制许多生物学行为,包括从性别决定到人类细胞的程序化死亡[7]。选择性剪接的异常是导致疾病的重要原因,引起疾病的单个碱基对突变中至少15%可影响剪接,因此剪接过程及其调控在疾病发生中起着非常重要的作用。人类基因通过选择性剪接产生多种mRNA,这些mRNA编码出功能上不同甚至相互拮抗的蛋白,这种选择性剪接事件的发生大部分是与细胞的特殊类型及对某些刺激的反应有关。在肿瘤中,一些基因的选择性剪接方式可发生显著变化,人类凋亡相关基因bcl-x,其发生选择性剪接异常可导致bcl-xL/bcl-xS值升高,具有抗凋亡的作用,阐明其选择性剪接确切发生机制,调控肿瘤细胞内bcl-xL/bcl-xS值将具有很大治疗潜能。

选择性剪接发生机制的研究主要是筛选出调控剪接的顺式元件,然后根据顺式元件的序列鉴定与之相互作用的反式作用因子。根据顺式作用元件所处的位置及其功能,分为4类,包括外显子剪接增强子、外显子剪接沉默子、内含子剪接增强子及内含子剪接沉默子。微基因用于监测mRNA在不同情况下选择性剪接可能发生的变化,是研究选择性剪接发生机制的经典方法,其主要用途包括:①鉴定外显子或内含子上增强或抑制剪接的序列元件;②鉴定细胞发生特异性调控时所需的序列元件;③鉴定反式作用因子进行特异性调控时所需的序列元件。我们利用构建好的bcl-x微基因成功地对该微基因进行定点突变及缺失突变并应用于白血病细胞内选择性剪接发生机制的研究。

B2G是由富含G嘌呤的30个碱基组成的顺式元件。Garneau等[6]研究发现在HeLa细胞中,hnRNP F/H蛋白通过结合该元件可增加bcl-xS 5′剪接位点的利用,bcl-xS比例上升,而缺失B2G元件则几乎不产生bcl-xS;神经酰胺反应性顺式作用元件2(ceramide-responsive cis-element 2,CRCE2)是富含嘧啶碱基的序列,Massiello等[5]证实该元件部分序列突变将使基因bcl-x选择性剪接的位点发生改变,使bcl-xL/bcl-xS值降低。因此,B2G、CRCE2对细胞中bcl-x基因的选择性剪接研究具有重要意义。本研究通过RT-PCR法检测发现bcl-x微基因及顺式作用元件B2G、CRCE2的突变微基因瞬时转染HL-60细胞后,B2G缺失使bcl-xS下降;CRCE2突变时仅轻度上调bcl-xL/bcl-xS值,两者比例变化不大很可能是由于该突变微基因在HL60细胞中没有受到调控。

bcl-x前mRNA选择性剪接容易受到外部环境的影响。研究发现依米丁(Emetine)这种蛋白合成抑制剂可以一种剂量时间依赖的方式下调bcl-xL mRNA,同时上调bcl-xS mRNA的水平[8];另外,能够诱导有丝分裂阻滞的药物可促进bcl-x向促凋亡方向发生选择性剪接,即bcl-xS上升[9]。因此选择性剪接很有可能成为药物开发的一个重要的靶点。目前,Bauman等[10]运用脂质纳米粒运输bcl-x SSOs(splicing-switch oligonucleotides)进行转移性黑素瘤体内研究发现,该SSOs通过调控bcl-x选择性剪接具有抗肿瘤的活性。在不同细胞中,通过bcl-x微基因报告法发现了参与bcl-x选择性剪接调控的相关顺式作用元件和反式作用因子,其中2个重要顺式元件为B2G、CRCE2。我们通过bcl-x微基因报告法研究发现顺式元件B2G、CRCE2在HL60细胞中对bcl-x选择性剪接作用不明显,说明bcl-x选择性剪接的调节具有细胞特异性,其顺式元件的调控受细胞内环境的影响,比如细胞内反式作用因子,包括Sam68[11]、Sc35[12]、SRp30c[13]和RBM25[14]等可参与bcl-x选择性剪接的调控。另外Revil等[15]发现位于bcl-xS剪接位点上游187个核苷酸的序列元件可依赖于蛋白激酶-C信号对bcl-xS剪接位点的利用产生抑制作用。可见,位于bcl-x 2个竞争性5′剪接位点间的序列有许多重要的剪接调控元件。本研究正是利用包含这些重要序列的bcl-x微基因及对重要顺式元件B2G、CRCE2的突变微基因的构建及应用,建立bcl-x微基因报告法,为深入探讨bcl-x选择性剪接机制打下基础。

参考文献:

[1] Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing[J]. Mol Cell, 2005, 19(1):1-13.

[2] Boise L H, Gonzalez-Garcia M, Postema C E, *et al*. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death [J]. Cell, 1993, 74(4):597-608.

[3] Castilla C, Congregado B, Chinchon D, *et al*. Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells *via* interaction with proapoptotic Bak[J]. Endocrinology, 2006, 147(10):4960-4967.

[4] Hossini A M, Eberle J, Fecker L F, *et al*. Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells *in vitro* and delays growth of melanoma xenografts[J]. FEBS Lett, 2003, 553(3):250-256.

[5] Massiello A, Salas A, Pinkerman R L, *et al*. Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide[J]. J Biol Chem, 2004, 279(16):15799-15804.

[6] Garneau D, Revil T, Fisette J F, *et al*. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic me-

diator Bcl-x[J]. J Biol Chem, 2005, 280(24): 22641 - 22650.
[7] Black D L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing [J]. Annu Rev Biochem, 2003, 72: 291 - 336.
[8] Boon-Unge K, Yu Q, Zou T, *et al*. Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism [J]. Chem Biol, 2007, 14(12): 1386 - 1392.
[9] Moore M J, Wang Q, Kennedy C J, *et al*. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis [J]. Cell, 2010, 142(4): 625 - 636.
[10] Bauman J A, Li S D, Yang A, *et al*. Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides [J]. Nucleic Acids Res, 2010. [Epub ahead of print].
[11] Paronetto M P, Achsel T, Massiello A, *et al*. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x[J]. J Cell Biol, 2007, 176(7): 929 - 939.
[12] Merdzhanova G, Edmond V, De-Seranno, *et al*. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35 [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(12): 1815 - 1823.
[13] Cloutier P, Toutant J, Shkreta L, *et al*. Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x [J]. J Biol Chem, 2008, 283(31): 21315 - 21324.
[14] Zhou A, Qu A C, Cho A, *et al*. Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(19): 5924 - 5936.
[15] Revil T, Toutant J, Shkreta L, *et al*. Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(24): 8431 - 8441.

(收稿 2010-09-08 修回 2010-10-07)
(编辑 张 维)

(上接 203 页)

无放置于下腔静脉之外,无术中血栓脱落导致肺栓塞、空气栓塞、穿刺处血肿及滤器倾斜等。术后已确诊 PE 的 5 例患者经积极抗凝、溶栓及祛聚等治疗后,下肢肿胀、疼痛等症状逐渐缓解,6 ~ 10 d 症状缓解较明显。3 例有咯血症状的患者大约 1 周咯血及胸背痛等症状基本消失。3 例颅内肿瘤术后及 4 例盆腔肿瘤术后患者,仅用半量低分子肝素及祛聚药物,下肢肿胀及疼痛症状缓解较慢,10 ~ 15 d 症状明显好转。5 例抗凝失败者及 6 例中央型静脉血栓患者经积极溶栓治疗,尿激酶 50×10^4 U/d,从患肢足背浅静脉滴注,症状 3 ~ 5 d 缓解明显。2 例抗凝并发症患者,溶栓治疗效果明显。5 例合并高血压的老龄患者,仅用尿激酶 10×10^4 U/d,合用低分子肝素及祛聚药物治疗,症状 8 ~ 14 d 缓解明显。

2.2 患者术后随访

术后 24 例患者随访 6 个月至 1 年,6 例失访,复查彩超或 X 线腹部平片,无下腔静脉梗阻、滤器移位、滤器上明显血栓形成及肺栓塞等并发症。5 例已有 PE 患者无呼吸困难、胸痛及再咯血症状。24 例随访者患肢较健侧下肢稍肿胀,小腿周径长 1 ~ 2 cm,站立久后稍有胀痛等不适表现,均建议穿弹力袜或气压波治疗。

3 讨论

股髂静脉血栓被认为引起 PE 的危险性最大。国外报道,应用下腔静脉滤器后,使 DVT 血栓脱落造成 PE 的发生率由 60% ~ 70% 下降至 0.9% ~ 5%。目前有多种成像技术用于引导 VCF 施放,在 X 线透视下、彩色多普勒超声和血管内超声引导下放置 VCF 均有报道[5-9]。彩超检查的技术特点是受腹腔内气体干扰较明显,胃肠道准备十分重要,术前 6 ~ 8 h 禁食,以及灌肠等都是减少肠胀气的有效方法。该技术对超声检查的准确度要求很高:首先,要确定下腔静脉和施放滤器的静脉通路无血栓形成,以避免术中造成血栓脱落而导致 PE。其次,要准确的测量下腔静脉的内径,避免将直径较小的滤器放置于过宽的下腔静脉,而导致 VCF 的脱落或移位。再者,要明确肾静脉与下腔静脉的开口位置,以确定 VCF 放置位置。将 VCF 放置于肾静脉开口之下的下腔静脉内,是技术操作的要点。无论是经颈内静脉或股静脉,在下腔静脉内寻找到输导管的顶端,均有利于彩超对放置 VCF 进行定位。由于彩超对血流信号更为敏感,经输送导管快速注入肝素盐水,此时彩超就会很容易的发现和定位导管的顶端。

该技术避免了下腔静脉滤器置入术前、术中和术后随访中 X 线和造影剂的使用,消除了放射污染,降低了医疗费用(每位患者节省费用达 4 000 ~ 5 000 元),并适用于造影剂禁忌证如肾功能不全和造影剂过敏患者,拓宽了临床应用范围,同时超声仪体积小、使用简便,适合床边操作,避免了重症患者移送的不便,具有很高的临床实用价值。

参考文献:

[1] Narayan A, Kim H, Hong K, *et al*, Clinical Outcomes After Inferior Vena Cava Filter (IVCF) Placement in Cancer Patients: A Retrospective Study [J]. Blood, 2009, 114(22): 441 - 444.
[2] Kai R, Imamura H, Kumazaki S, *et al*. Temporary inferior vena cava filter for deep vein thrombosis and acute pulmonary thromboembolism: effectiveness and indication[J]. Heart Vessels, 2006, 21(4): 221 - 225.
[3] Crowther M A. Inferior vena cava filters in the management of venous thromboembolism[J]. Am J Med, 2007, 120(10 Suppl 2): S13 - S17.
[4] Janne-d'Othee B, Faintuch S, Reedy A W, *et al*. Retrievable versus permanent caval filter procedures: when are they cost-effective for interventional radiology? [J]. J Vasc Interv Radiol, 2008, 19(3): 384 - 392.
[5] Ramaswami G, Nicolaides A N. The cost-effectiveness of mechanical forms of DVT prophylaxis in general surgery[J]. Int Angiol, 1996, 15(3 Suppl 1): 21 - 26.
[6] Grassi C J. Inferior vena cava filter: analysis of five currently available devices[J]. AJR Am J Roentgenol, 1991, 156(4): 813 - 821.
[7] 张青云, 高建国, 陈泳, 等. 下腔静脉滤器植入及导管溶栓在下肢深静脉血栓形成治疗中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(17): 1887 - 1890.
[8] Oshima K, Kunimoto F, Hinohara H, *et al*. The effect of a temporary inferior vena cava filter in the treatment of deep vein thrombosis in critically-ill patients[J]. Int Heart J, 2008, 49(6): 713 - 721.
[9] Ozbudak O, Erogullari I, Ogus C, *et al*. Doppler ultrasonography versus venography in the detection of deep vein thrombosis in patients with pulmonary embolism[J]. J Thromb Thrombolysis, 2006, 21(2): 159 - 162.

(收稿 2010-08-12 修回 2010-09-26)
(编辑 吴培红)