文章编号:1000-5404(2012)10-0933-05

论著

HBV X基因转染L02细胞及其蛋白产物对CⅡTA和HLA-DR表达的影响

张 卿,李俊刚,刘玉元,赵 博,张绪清 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所)

[摘要] **目的** 探讨脂质体和电穿孔法在HBV X基因转染L02细胞中的差别及X基因蛋白产物对CⅡTA和HLA-DR表达的影响。**方法** 构建HBV X基因重组表达质粒,通过电穿孔和脂质体法转染人正常肝细胞L02细胞,以绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein,EGFP)表达水平评价转染效率,流式细胞技术检测L02细胞HBV X蛋白的表达水平。RT-PCR、流式细胞技术及western-blot分析L02细胞、转染空载体以及转染HBV X基因重组表达质粒的L02细胞CⅡTA和HLA-DR的表达差别。**结果** 采用阳离子脂质体Lipofectamine 2000的转染效率为(6.4±3.5)%,显著低于电穿孔法(41.46±5.8)%,$P<0.01$。脂质体法转染的L02细胞HBV X蛋白表达水平为(5.1±3.9)%,显著低于电穿孔方法(37.5±4.1)%表达,$P<0.01$。转染了HBV X基因重组表达质粒的L02细胞检测到CⅡTA和HLA-DR mRNA和蛋白表达,而L02细胞本身及转染空载体的L02细胞未检测到CⅡTA和HLA-DR的表达。**结论** HBV X基因真核表达载体pHBx-IRES2 -EGFP通过电穿孔法转染L02细胞较脂质体法有明显较高的转染效率和更高的目的基因的表达,HBV X基因诱导了L02细胞中CⅡTA和HLA-DR的表达。

[关键词] HBV X基因;脂质体;电穿孔;HLA-DR;CIITA
[中图法分类号] R373.21;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Transfection of HBV X gene into human liver cell line L02 and its effect on CIITA and HLA-DR expression

Zhang Qing, Li Jungang, Liu Yuyuan, Zhao Bo, Zhang Xuqing (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the efficiency difference between lipofection and electroporation for HBV X gene transfection and the effects of HBV X protein (HBx) on CIITA and HLA-DR expression in human liver cell line L02. Methods Recombinant expression plasmid pHBx-IRES2-EGFP was constructed and transferred into normal human liver cell line L02 with Lipofectamine 2000 and electroporation respectively. The transfection efficiency was evaluated by the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) under a fluorescent microscope. Flow cytometry was used to detect HBx protein expression. RT-PCR, flow cytometry and Western blot analysis were used to determine HLA-DR and CIITA expression in L02 cells, L02 cells transfected with pIRES2-EGFP, and L02 cells transfected with pHBx-IRES2-EGFP respectively. Results The transfection efficiency with Lipofectamine 2000 was (6.4±3.5)%, significantly lower than that with electroporation [(41.46±5.8)%, $P<0.01$]. The HBx expression in the L02 cells transfected by Lipofectamine 2000 was significantly lower than that in the L02 cells transfected by electroporation [(5.1±3.9)% *vs* (37.5±4.1)%, $P<0.01$]. The CIITA and HLA-DR expression was only detected in the L02 cells transfected with pHBx-IRES2-EGFP. Conclusion Using recombinant expression plasmid pHBx-IRES2-EGFP, HBV X gene transfection mediated by electroporation achieves a higher efficiency and a higher HBx expression level in L02 cell lines than that mediated by Lipofectamine 2000. HBx induces CIITA and HLA-DR expression in L02 cells.

[**Key words**] HBV X gene; lipofectamine; electroporation; HLA-DR; CIITA

Supported by the General Program of National Natural Sience Foundation (30872229) and the National Science Foundation for Young Scholars (30800981).
Corresponding author: Zhang Xuqing, Tel: 86-23-68765219, E-mail: xuqing651005@tom.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30872229);青年科学基金项目(30800981)
[通信作者] 张绪清,电话:(023)68765219,E-mail:xuqing651005@tom.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染是肝脏疾病和肿瘤的主要病因之一。HBV 基因组呈松弛环状双链结构,含有 4 个开放读码框架,其中 X 区所编码的产物 HBx 蛋白(hepatitis B virus x protein,HBx)是一种多功能的调节蛋白,具有广泛的反式激活功能[1]。HBV X 基因功能已逐渐成为近年来研究的焦点。MHC Ⅱ类分子是向 Th 细胞提呈外来抗原的主要呈递者,通常表达于抗原提呈细胞以及活化的 T 细胞等,其限制的 $CD4^+$ T 细胞介导的免疫应答在 HBV 感染者病毒清除和肝损伤中起重要作用。MHC Ⅱ类分子的表达是由多个细胞因子调控的,包括Ⅱ类反式激活因子(CⅡTA),调节因子 X(RFX)家族,NF-Y 和 CREB 等。其中 CⅡTA 被认为是 MHC Ⅱ类分子表达调控的"限速因子"[2]。HLA-DR 是人类主要组织相容性Ⅱ类抗原中的一种,在慢性乙型肝炎发病机制中,CⅡTA 和 HLA-DR 的表达及其与 HBx 蛋白之间的关系有待进一步的探讨。因此,本研究首先构建了以绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP)为报告基因的 HBV X 基因真核表达质粒 pHBx-IRES2-EGFP,采用基因转染中常用的脂质体和电穿孔技术[3],比较两种技术在 L02 细胞中的转染效率及对目的基因表达的影响,并检测了 HBV X 基因转染 L02 细胞后其蛋白产物对 CⅡTA 和 HLA-DR 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

小牛血清购自甘肃民海生物公司;RPMI1640 购自 GIBCO;鼠抗人 HLA-DR 单克隆抗体及鼠抗人 CⅡTA 单克隆抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,HBx 蛋白抗原一抗购自 Abcam 公司;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司;Quantscript RT Kit、2 × pfu PCR MasterMix 购自北京天根生化科技有限公司;DNA Marker(DL2000)购自 TaKaRa 公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2 HBV X 基因的获取

引物设计与合成:根据 HBV X 基因自行设计引物,上游引物引入 *Eco*R1 内切酶酶切位点。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列:F:5′-TGAGAATTCTGTCGTGCTCTCCCGCAAGTA-3′; R: 5′-CGAGGAGATCTCGAATAGAA-3′。所得的 PCR 产物大小为 750 bp。HBV 基因组 DNA 由我实验室所保存患者血清提取。加入设计的上、下游引物进行扩增。条件如下:95 预变性 2 min 后,95 ℃ 变性 45 s,54 ℃退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。凝胶电泳鉴定。进行酶切反应,琼脂糖电泳后回收 PCR 产物。

1.3 pHBx-IRES2-EGFP 重组质粒的构建及鉴定

*Eco*RⅠ、*Bam*H1 双酶切载体质粒,*Eco*RⅠ、*Bgl*Ⅱ双酶切 PCR 扩增产物,琼脂糖电泳鉴定后回收纯化目的片段。T_4 DNA 连接酶作用下将目的片段与载体质粒连接。$CaCl_2$法转化感受态菌,挑取阳性菌落扩增,抽提质粒。所得质粒经酶切鉴定正确后委托华大基因公司测序。

1.4 细胞培养及处理

L02 细胞株是来源于人正常肝组织的肝细胞,为我研究所保存。细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中 37 ℃,5% CO_2浓度条件下培养。

1.5 脂质体转染

转染试剂为 Lipofectamine 2 000。具体的转染步骤按试剂说明进行。24 h 后荧光显微镜下观察转染效率,并可通过流式细胞技术检测 HBV X 基因及 HLA-DR 的表达。

1.6 电穿孔转染

转染设备为 Gene Pulser Xcell(Bio-Rad)。细胞接种于 75 cm^2培养瓶中,密度至 60% ~75% 时进行转染。电转策略:电压:0.25 kV;电容:500 μF;电转时间:17 ms。电转后细胞接种至 6 孔板。24 h 后荧光显微镜下观察转染效率,并可通过流式细胞技术检测 HBV X 基因及 HLA-DR 的表达。

1.7 流式细胞技术检测 HBV X 基因及 HLA-DR 表达

1.7.1 HBV X 基因表达的检测 取 2×10^5 转染后细胞,消化后离心,PBS 洗 2 次,冰上通透 10 min(0.1% Triton + 5% BSA);HBx 蛋白抗原一抗 1∶50 稀释后室温孵育 30 min,PBS 洗 2 次,去掉上清,加入 1∶50 稀释 FITC 标记的二抗,4 ℃避光 30 min,PBS 洗 2 次,200 μl 4% 多聚甲醛重悬后 BD FACS Aria 流式细胞仪(BD,USA)检测分析。

1.7.2 HLA-DR 表达的检测 取 2×10^5 转染后细胞,消化后离心,PBS 洗 2 次,HLA-DR 单抗 1∶250 稀释后室温孵育 30 min,PBS 洗 2 次,去掉上清,加入 1∶50 稀释 FITC 标记的二抗,4 ℃避光 30 min,PBS 洗 2 次,200 μl 4% 多聚甲醛重悬后 BD FACS Aria 流式细胞仪(BD,USA)检测分析。

1.8 RT-PCR 检测 HLA-DR 及 CⅡTA mRNA

用 Trizol 抽提细胞总 RNA。逆转录反应体系:10 × RT mix 2 μl,dNTP 混合液 2 μl, Oligo-dT15 2 μl,Quant Reverse Transcriptase 1 μl,总 RNA 5 μl,RNase-free 水加至 20 μl,37 ℃孵育 60min。PCR 扩增:HLA-DR 上游引物序列 5′-CATAAGTGGAGTCCCTGTGCTA-3′,下游引物序列 5′-CATTGGTGATCGGAGTATAGTTG-3′; CⅡTA 上游引物序列 5′-CTGTCCCAGAACAACATCAC-3′,下游引物序列 5′-CACATCGCCAGCGTCTC-3′。反应体系:cDNA 5 μl, 2 × Master Mix 12.5 μl,F、R 引物各1 μl,ddH_2O 加至 25 μl。反应条件为:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。取 5 μl 扩增产物进行凝胶电泳分析。

1.9 Western blot 检测 CⅡTA 表达

预冷的 PBS 收集细胞,提取总蛋白后,测定浓度,以每孔 30 μg 蛋白加入 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后,4 ℃,50 V 条件下电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 CⅡTA 一抗

稀释液,4 ℃过夜;TBS 洗涤,加入 HRP 标记的二抗,室温作用 1 h,增强化学发光(ECL)法检测结果。

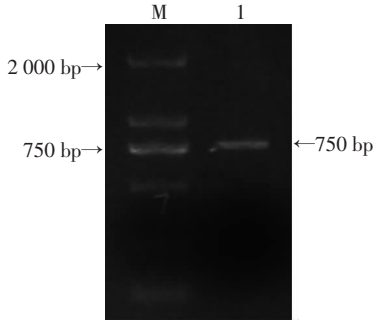
1.10 统计分析

采用 SPSS 13.0 分析软件,两组比较采用 t 检验。

2 结果

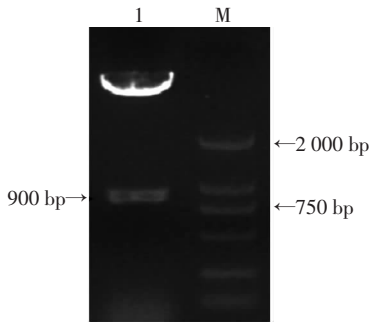
2.1 构建 pHBx-IRES2-EGFP 重组质粒的结果

HBV X 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后出现 750 bp 左右大小条带,与预期相符,表明已获得 HBV X 基因片段(图 1)。重组质粒 pHBx-IRES2-EGFP 经限制性内切酶 *Hind* Ⅲ酶切后电泳,分别切出与对应目的基因及酶切位点片段预期相符的条带以及与空载体大小相符的另 1 条带(图 2)。这表明重组表达载体已成功构建。



M:标准;1:HBV X

图 1　PCR 扩增 HBV X 基因片段电泳结果



M:标准;1:pHBx-IRES2-EGFP

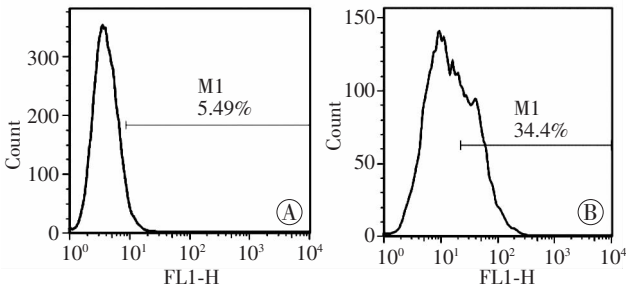
图 2　*Hind* Ⅲ酶切鉴定重组质粒 pHBx-IRES2-EGFP 电泳结果

2.2 荧光显微镜下观察重组质粒转染 L02 细胞后 EGFP 表达的结果

以 EGFP 为报告基因,观察转染效率。按照如下公式计算转染效率:转染效率 = 暗视野所见发绿色荧光细胞数/明视野所见细胞数。通过脂质体法将重组质粒转染 L02 细胞 24 h 后,荧光显微镜下观察 EGFP 表达,转染效率为(6.4 ± 3.5)%(图 3A)。通过电转染法将重组质粒转染 L02 细胞 24 h 后,荧光显微镜下观察 EGFP 表达,转染效率为(41.46 ± 5.8)%(图 3B),显著高于脂质体转染组,$P < 0.01$。

2.3 流式细胞技术分析重组质粒转染 L02 细胞后 HBx 表达结果

通过脂质体法将重组质粒转染 L02 细胞 48 h 后,流式细胞技术分析 HBx 蛋白表达,结果显示获得 HBx^+-$L0_2$ 细胞表达 HBx 抗原阳性率低(图 4A),其表达率为(5.1 ± 3.9) %。通过电转染法将重组质粒转染 L02 细胞 48 h 后,流式细胞技术分析 HBx 蛋白表达,结果显示获得 HBx^+-$L0_2$ 细胞表达 HBx 抗原阳性率高,其表达率为(37.5 ± 4.1)%(图 4B),显著高于脂质体转染组,$P < 0.01$。

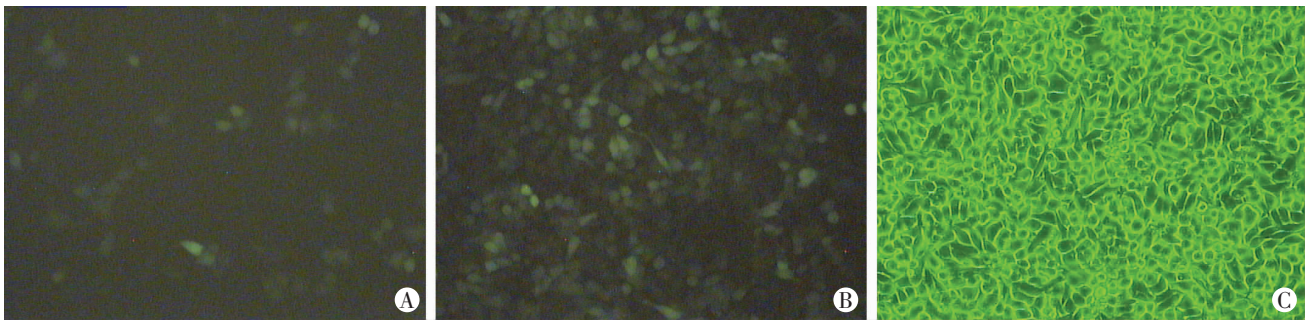


A:脂质体法转染 L02 细胞后流式分析 HBx 蛋白表达;B:电穿孔法转染 L02 细胞后流式分析 HBx 蛋白表达

图 4　流式细胞技术检测重组真核表达载体 pHBx-IRES2-EGFP 转染 L02 细胞 48 h 后 HBx 蛋白表达

2.4 转染前后 L02 细胞 CⅡTA 和 HLA-DR mRNA 的表达

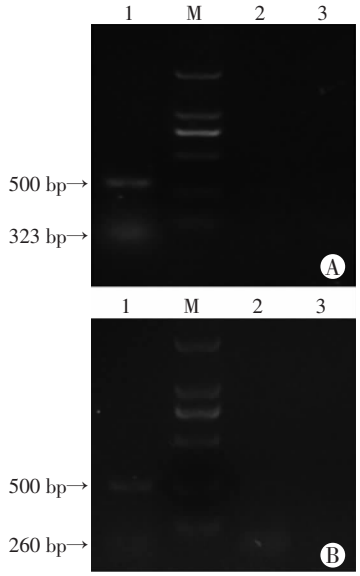
转染真核表达载体 pHBx-IRES2-EGFP 的 L02 细胞所提的 RNA 能反转录扩增出长约 323 bp 及 260 bp 的特异性条带,说



A:脂质体法转染 L02 细胞,发绿色荧光为表达 EGFP 的 L02 细胞;B:电穿孔法转染 L02 细胞,发绿色荧光为表达 EGFP 的 L02 细胞;C:倒置显微镜下未转染的 L02 细胞

图 3　荧光显微镜观察重组真核表达载体 pHBx-IRES2-EGFP 转染 L02 细胞 24 h 后 EGFP 的表达及未转染的 L02 细胞变化　(×400)

明其有CⅡTA和HLA-DR mRNA的表达。而L02细胞本身及转染空载体pIRES2-EGFP的L02细胞所提的RNA不能反转录扩增出CⅡTA和HLA-DR cDNA,因此没有CⅡTA和HLA-DR mRNA的表达(图5)



M:标准;1:L02+HBV X;2:L02;3:L02+空载体
A:HLA-DR mRNA的表达;B:CⅡTA mRNA的表达

图5 RT-PCR检测L02细胞、转染空载体及转染pHBx-IRES2-EGFP真核表达载体的L02细胞HLA-DR和CⅡTA mRNA的表达

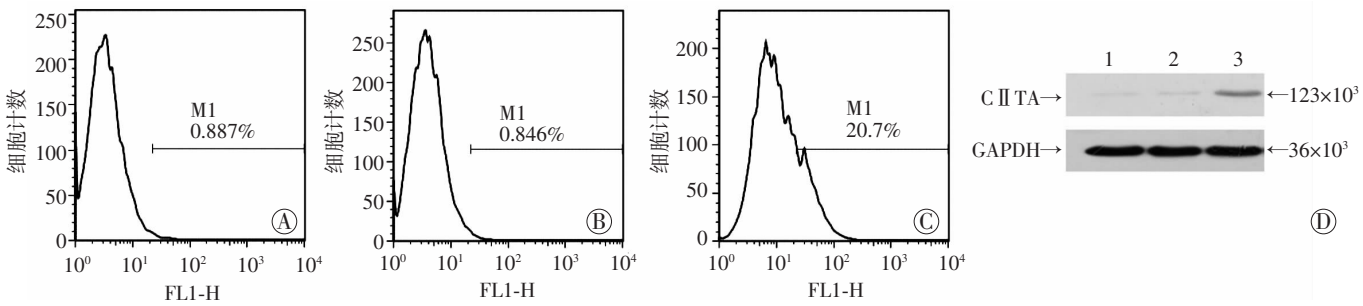
2.5 转染前后L02细胞HLA-DR和CⅡTA蛋白分子的表达

转染真核表达载体pHBx-IRES2-EGFP的L02细胞检测到CⅡTA和HLA-DR分子的表达,而L02细胞本身及转染空载体pIRES2-EGFP的L02细胞无CⅡTA和HLA-DR分子的表达。结果如图6。

3 讨论

CⅡTA是HLA-DR表达的重要调控因子,已有报道显示在胃癌、结肠癌细胞中,HLA-DR的表达缺失与CⅡTA的表观遗传沉默密切相关[4];在不同的细胞中,导致CⅡTA基因表观遗传沉默机制存在差异,在胃癌细胞中是由其启动子甲基化引起,而在白血病则是由其启动子的甲基化和组蛋白的去乙酰化共同所致,而通过逆转这种异常的甲基化或去乙酰化修饰则能恢复细胞中CⅡTA的表达,从而恢复HLA-DR的表达[5]。在本研究中,通过将HBV X基因转染L02细胞,我们发现HBV X基因蛋白产物诱导了L02细胞中CⅡTA和HLA-DR的表达,而转染了空载体的L02细胞及L02细胞本身均未检测到CⅡTA和HLA-DR的表达。HBx是一个具有广泛生物学作用的反式作用因子,既可激活信号转导系统,又可直接作用于细胞转录因子,还能通过上调如DNA甲基转移酶和组蛋白去乙酰化酶等的表达参与宿主基因的表观遗传调节,导致宿主基因的表观遗传沉默[6-8]。而其在L02细胞中激活CⅡTA和HLA-DR表达则提示在正常肝细胞中,HBx可能通过更复杂的机制调节了CⅡTA和HLA-DR的表达,CⅡTA是否存在异常的表观遗传修饰及其与HBx的关系则需进一步的探讨。

HLA-DR参与介导抗原提呈$CD4^+$辅助性T细胞的活化与增殖等免疫应答,有报道认为HLA-DR抗原不仅与慢性肝炎的炎症程度相关,而且与癌组织分化程度有关[9]。文献[10]报道显示HBx蛋白能诱导肝癌细胞中HLA-DR的表达,但在正常肝细胞中的研究尚少,我们结果则显示了HBV X基因蛋白产物诱导了人正常肝细胞L02细胞中HLA-DR的表达。HLA-DR作为免疫反应中重要的呈递分子,能导致辅助性T细胞的激活和分化,从而在诱发免疫应答中起重要作用,而HBx蛋白在正常肝细胞中对HLA-DR的诱导表达作用,提示了HBx蛋白在慢性肝炎的免疫发病机制中可能通过激活HLA-DR表达而诱发肝脏的免疫反应而发挥作用。同时也有研究发现了在乙肝相关的肝癌



A~C:HLA-DR分子的表达,A:L02;B:L02+空载体;C:L02+HBV X;D:CⅡTA分子的表达

图6 L02细胞、转染空载体及转染pHBx-IRES2-EGFP真核表达载体的L02细胞HLA-DR和CⅡTA分子的表达

组织中缺乏 HLA-DR 的表达[11],这显示 HLA-DR 在慢性乙型肝炎和乙肝相关肝癌发生、发展中可能发挥不同的作用。

我们还同时比较了脂质体和电穿孔转染法在 HBV X 基因真核表达载体转染 L02 细胞中效率的差别及目的基因的表达情况,结果显示电穿孔法转染效率显著高于脂质体法且目的基因表达更高。脂质体法是常用的转染方法,文献[12]报道其有转染效率高、安全、细胞毒性小、无免疫原性等优点。但是在我们的实验中,脂质体法转染效率却较低,可能的原因是:①可能与细胞的物种来源有关,细胞表面可能缺乏特异性受体[13];②L02 细胞是贴壁细胞,而脂质体转染方法对于悬浮细胞和贴壁细胞转染效率相差很大[14];③可能与其细胞毒性有关[15]。电穿孔法也是分子生物学中常用的技术,广泛应用于基因克隆、外源基因的表达、基因定位、基因图谱的绘制等研究[16]。在我们的实验中,电穿孔法获得较高的转染效率及较好的目的基因的表达,但是电穿孔也存在细胞死亡率较高,引起细胞融合从而影响细胞性状和生长等问题[17],因此,电穿孔的转染应包括对细胞生长密度,细胞生长周期,电场强度、脉冲时间、电击前后冰浴时间、质粒的大小、浓度等等转染条件最佳化的摸索[18-20]。

总之,我们成功的构建了 HBV X 的稳定表达载体;然后同时采用了脂质体和电穿孔转染的方法,将重组质粒转染 L02 细胞,我们发现了电穿孔的方法得到了明显较好的转染效果,同时发现 HBV X 基因诱导了 L02 细胞中 CⅡTA 和 HLA-DR 的表达,这一结果为进一步研究 HBV X 基因功能及 HLA-DR 在慢性肝炎和肝癌发病机制中的作用打下基础,也为类似的工作提供了借鉴。

参考文献:

[1] Tang H, Oishi N, Kaneko S, *et al*. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein[J]. Cancer Sci, 2006, 97(10): 977-983.

[2] Bewry NN, Bolick S C, Wright K L, *et al*. GTP-dependent recruitment of CIITA to the Class II major histocompatibility complex promoter[J]. J Biol Chem, 2007, 282(36): 26178-26184.

[3] Colosimo A, Goncz K K, Holmes A R, *et al*. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells[J]. Biotechniques, 2000, 29(2): 314-318, 320-322, 324.

[4] Satoh A, Toyota M, Ikeda H, *et al*. Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(55): 8876-8886.

[5] Morimoto Y, Toyota M, Satoh A, *et al*. Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells[J]. Br J Cancer, 2004, 90(4): 844-852.

[6] Zhou Y, Wang S, Ma J W, *et al*. Hepatitis B virus protein X-induced expression of the CXC chemokine IP-10 is mediated through activation of NF-kappaB and increases migration of leukocytes[J]. J Biol Chem, 2010, 285(16): 12159-12168.

[7] Liu L P, Liang H F, Chen X P, *et al*. The role of NF-kappaB in Hepatitis b virus X protein-mediated upregulation of VEGF and MMPs[J]. Cancer Invest, 2010, 28(5): 443-451.

[8] Zheng D L, Zhang L, Cheng N, *et al*. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A[J]. J Hepatol, 2009, 50(2): 377-387.

[9] 柏秀娟, 张绪清. MHCⅡ类反式激活因子在上调 HepG2 细胞 HLAⅡ类分子表达中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2019-2022.

[10] 邬光惠, 黄耀煊, 孙殿兴, 等. 乙型肝炎病毒 x 基因的蛋白产物对 HLA-DR 表达的效应[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2002, 11(1): 20-22.

[11] Matoba K, Iizuka N, Gondo T, *et al*. Tumor HLA-DR expression linked to early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2005, 115(2): 231-240.

[12] Dass C R, Walker T L, Burton M A. Liposomes containing cationic dimethyl dioctadecyl ammonium bromide: formulation, quality control, and lipofection efficiency[J]. Drug Deliv, 2002, 9(1): 11-18.

[13] Zuhorn I S, Engberts J B, Hoekstra D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers[J]. Eur Biophys J, 2007, 36(4/5): 349-362.

[14] Smith C C, Lynch A M, Gooderham N J. Evaluating the genetic toxicology of DNA-based products using existing genetic toxicology assays[J]. Mutagenesis, 2003, 18(3): 259-264.

[15] 马晶莹, 谭晓华, 陈媛媛, 等. EGFP-CD40L 融合基因的构建、表达及功能鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1261-1266.

[16] Valero A, Post J N, van-Nieuwkasteele J W, *et al*. Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device[J]. Lab Chip, 2008, 8(1): 62-67.

[17] Sandri M, Bortoloso E, Nori A, *et al*. Electrotransfer in differentiated myotubes: a novel, efficient procedure for functional gene transfer[J]. Exp Cell Res, 2003, 286(1): 87-95.

[18] 李南, 凌世淦, 吴梧桐. 电穿孔法转化大肠杆菌 TG1 的条件优化[J]. 药物生物技术, 2001, 8(3): 143-146.

[19] Cemazar M, Sersa G. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues[J]. Curr Opin Mol Ther, 2007, 9(6): 554-562.

[20] 张建琼, 谢维, 谢维, 等. 高效电转化率条件的探索[J]. 南京师大学报:自然科学版, 2000, 23(2): 72-75.

(**收稿**:2012-02-08;**修回**:2012-03-13)

(编辑 王 红)