维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0652-05

多房棘球绦虫重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗的构建及其表达效率

杨 梅,李文桂,朱佑明

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建多房棘球绦虫(Echinococcus multilocularis,Em)重组双歧杆菌(Bifidobacteria bifidum,Bb)-EmⅡ/3 疫苗,并研究 EmⅡ/3 分子在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达效率。方法:通过 PCR 扩增 EmⅡ/3 抗原编码基因;将该基因定向克隆于含有谷胱甘肽 -S- 转移酶(Glutathione s-transferase,GST)基因的大肠埃希菌—双歧杆菌穿梭表达载体 pGEX-1λT,构建重组质粒 pGEX-EmⅡ/3;用电穿孔法将该质粒导入 Bb,构建多房棘球绦虫重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗。经 PCR 和酶切鉴定后以 IPTG 诱导表达 EmⅡ/3/GST 融合蛋白;SDS-PAGE 及 Western blot 对表达产物进行鉴定。结果:PCR 成功扩增出 1 759bp 的 EmⅡ/3 基因;双酶切证实 EmⅡ/3 基因插入 pGEX-1λT 中;PCR 和双酶切证实重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗构建成功;SDS-PAGE 及 Western blot 分析显示重组质粒转化宿主菌在 IPTG 诱导下高效表达了 EmⅡ/3/GST 融合蛋白。结论:成功构建了多房棘球绦虫重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗,重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 在大肠杆菌中获得了高效表达,Western blot 结果提示表达出的 EmⅡ/3 重组蛋白具有特异的抗原活性。

【关键词】多房棘球绦虫;重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗;构建;表达

【中国图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-03

Construction and expression efficiency of recombinant Bb-EmⅡ/3 vaccine of echinococcus multilocularis

YANG Mei,et al

(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To construct recombinant Bb-EmⅡ/3 vaccine of Echinococcus multilocularis and to investigate the expression efficiency of EmⅡ/3 antigen encoding gene in Escherichia coli BL21 (DE3). *Methods*:EmⅡ/3 antigen gene was amplified by PCR. Then the gene was cloned into Escherichia coli-Bifidobacteria shuttle plasmid pGEX-1λT containing gluathione-S-transferaze (GST) gene to construct pGEX-EmⅡ/3. The recombinant plasmid was electroporated into Bifidobacteria bifidum(Bb) to construct rBb-EmⅡ/3 vaccine. The vaccine was identified with PCR and restriction-endonuclease digestion. The expression of pGEX-EmⅡ/3 was induced with isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG),and fusion protein EmⅡ/3/GST was examined by SDS-PAGE and Western blot techniques. *Results*:1 759bp gene of EmⅡ/3 was successfully amplified by PCR and cloned into pGEX-1λT by restriction analysis. rBb-EmⅡ/3 vaccine was successfully constructed according to PCR and restriction-endonuclease digestion.It was demonstrated with SDS-PAGE and Western blot that the fusion protein EmⅡ/3/GST were expressed in E.coli,BL21. *Conclusions*:rBb-EmⅡ/3 vaccine of Echinococcus multilocularis is successfully constructed. The plasmid pGEX-EmⅡ/3 was highly expressed in E.coli in fused form with GST and this kind of protein shows specific antigenicity according to western blot.

【Key words】 Echinococcus multilocularis;Recombinant Bb-EmⅡ/3 vaccine;Construction;Expression

多房棘球蚴病(Alveolar echinococcosis,AE)是由 Em 的续绦期幼虫寄生在人体肝脏引起的一种严重危害人体健康的人畜共患寄生虫病,研制疫苗是防治该病的有效途径之一。当前,分子生物学技术的发展为研制理想的 Em 疫苗提供了新方法,将 Em 外源 DNA 引入特定疫苗载体构建重组活疫苗,可将保护性抗原传递至宿主免疫系统。王昌源等[1]发现 EmⅡ/3 重组抗原(ELP 蛋白)是一种有较好保护

作者介绍:杨 梅(1982-),女,硕士,
研究方向:分子生物学的研究。

通讯作者:李文桂,男,研究员,E-mail:li_wengui@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30671835 和 No.30500423 和 No.30200239)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

性免疫力的抗原分子，李文桂等[2]用重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗免疫 BALB/c 鼠可诱导小鼠产生保护性免疫反应，Missich 等[3]将重组质粒成功转化到双歧杆菌，从而为发展双歧杆菌成为疫苗载体提供了有力的工具。因此，本研究将泡球蚴 EmⅡ/3 抗原编码基因插入大肠埃希菌—双歧杆菌，穿梭表达载体 pGEX-1λT，构建 pGEX-EmⅡ/3，用电穿孔法转化 Bb，构建重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗，研究 EmⅡ/3 分子在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达效率，为泡球蚴病的免疫预防提供一种有价值的疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 高保真即用 PCR 扩增试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂、高效感受态细胞制备试剂盒、UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、丙烯酰胺和 DAB 显色剂购自上海生工公司；T4DNA 连接酶、DNA Marker、*BamH* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ购自 Fermentas 公司；中分子量蛋白标准购自重庆百萃公司；硝酸纤维素膜(NC 膜)及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(HRP IgG)购自北方同正；活动性泡球蚴病小鼠血清(一抗)由本室制备。

1.1.2 DNA 模板 pCD-EmⅡ/3[4]由本室构建和保存。

1.1.3 质粒和宿主菌 大肠埃希菌—双歧杆菌穿梭表达载体 pGEX-1λT 购自华西医科大学微生物学教研室，Bb 购自武汉大学菌种保存中心，BL21 大肠埃希菌由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 泡球蚴 EmⅡ/3 基因的扩增

1.2.1.1 PCR 扩增 EmⅡ/3 基因 根据基因库 EmⅡ/3(U05573)的 DNA 序列设计引物，P1：5'-CGGGATCCTAT-GTTGAAGAG-3'为上游引物，5'端引入 *BamH* Ⅰ位点，P2：5'-TCTGAATTCCTACATCGACTC-3'为下游引物，5'端引入 *EcoR* Ⅰ位点。引物由上海生工公司合成。以 pCD-EmⅡ/3 为模板，P1 和 P2 为引物，PCR 扩增 EmⅡ/3 基因片段，扩增条件：94℃预变性 5min，94℃变性 45s，45℃退火 25s，72℃延伸 3.5min，共 30 个循环，最后 72℃延伸 10min。

1.2.1.2 PCR 产物纯化、电泳鉴定以及测序 PCR 产物纯化按照 PCR 产物纯化试剂盒说明书操作，然后取 3μl 纯化产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。并以 P1 和 P2 为测序引物对克隆的基因进行测序，由上海生工公司完成。

1.2.2 重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 的构建

1.2.2.1 目的基因和载体大片段的制备 EmⅡ/3 基因 PCR 产物和质粒 pGEX-1λT 分别用 *BamH* Ⅰ及 *EcoR* Ⅰ酶双酶切，酶切体系各 60μl：目的基因或载体 42μl、*BamH* Ⅰ 1.3μl、*EcoR* Ⅰ 1.3μl、10×Buffer 6μl、灭菌去离子水 9.4μl。置 37℃水浴 2h，酶切产物用 PCR 纯化试剂盒纯化。

1.2.2.2 连接 按照酶切后载体与目的基因约 1∶5 的摩尔比及 T4DNA 连接酶说明建立 20μl 的连接体系，目的基因 8μl、载体大片段 8μl、10×Buffer2μl、T4DNA 连接酶 2μl。4℃过夜后，置 70℃10min，灭活 T4DNA 连接酶。

1.2.2.3 连接产物的扩增和酶切鉴定 将连接产物转化 BL21 感受态细菌，37℃200r/min 振摇培养 1h，随即接种在含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上，37℃孵育 16～18h，挑取单个菌落至含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃ 200r/min 振摇培养 12～18h，用质粒抽提试剂盒提取重组质粒 pGEX-EmⅡ/3。然后用 *BamH* Ⅰ及 *EcoR* Ⅰ酶对该重组质粒进行双酶切鉴定，酶切体系类似目的基因和载体大片段的制备。

1.2.3 Bb 的培养及转化 取 Bb 菌种，加入 0.2ml 含 0.5mol/L 蔗糖的 MRS 液体培养基，振荡混匀，使冻干粉溶解，将其接种于 100ml 上述 MRS 液体培养基中，37℃厌氧培养 24～72h，冰浴 2.5h。4℃ 5 000r/min 离心 10min，弃上清；加入预冷的 10%甘油 50ml，4℃ 3 000r/min 离心 10min，弃上清；加入预冷的 10%甘油 25ml，4℃ 2 000r/min 离心 10min，弃上清；加入预冷的 10%甘油 10ml，4℃ 1 500r/min 离心 10min，弃上清；加入预冷的 10%甘油 1.5ml，混匀，此细菌可直接用于电转化。取 80μl 细菌加入含 20μl 重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 的 Ep 管中，混匀，冰浴 1min 后转移至电穿孔杯中(规格为 0.1cm)；电穿孔参数设置：电压为 1.2kV、转化时间为 5ms、转化次数为 2 次，转化完毕后 rBb 在电穿孔杯中停留 5～10min，加入 1ml 含 0.5mol/L 蔗糖的 MRS 液体培养基，轻轻混匀，转入 1.5mlEp 管中，37℃厌氧培养 2h。取全部菌液涂布于含 50μg/ml 氨苄青霉素的 MRS 琼脂平板上，37℃厌氧培养 72h。

1.2.4 重组 Bb 疫苗的鉴定 取上述筛选培养基上单一的 rBb 菌落，加入 100ml 含 0.5mol/L 蔗糖的 MRS 液体培养基中厌氧培养 24～72h，用质粒抽提试剂盒提取质粒。然后用双酶切和 PCR 鉴定重组质粒。

1.2.5 诱导表达及 SDS-PAGE 电泳 将经鉴定后的阳性重组质粒转化 BL21 感受态细菌，接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中，37℃ 250r/min 振摇培养至 OD 值 0.5～0.8 时，加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L，继续培养 1、3、5、7、9、11、13h。分别收集 1ml 未诱导及诱导表达菌液的菌体，以 50μl 的 1×蛋白上样缓冲液重悬后煮沸 5min，分别取 20μl 进行聚丙烯酰胺凝胶(10%分离胶及 5%积层胶)电泳分析，考马斯亮蓝染色。染色后凝胶置 Bio Rad Gel Doc1000 凝胶成像仪成像，结果用图像分析系统进行分析。

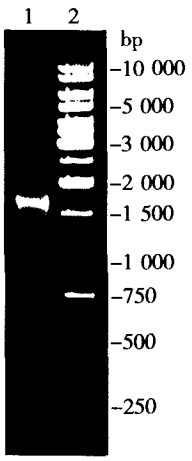
1.2.6 免疫印迹分析(Western-blot) 将诱导表达的菌体蛋白作 SDS-PAGE 后，用半干转移系统将凝胶上的蛋白质转印到 NC 膜上，于封闭液中室温摇床封闭 3h；用 PBS 洗涤 4 次，每次 10min；用封闭液稀释的 1∶100 活动性泡球蚴病鼠血清室温摇床孵育 2h；用 PBS 洗涤 4 次，每次 10min；用封闭液稀释的 1∶1 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 室温摇床

维普资讯 http://www.cqvip.com

孵育 2h;用含 150mmol/LNaCl 和 50mmol/LTris-Cl(pH7.5)的洗涤液洗涤 3 次,每次 10min;用 DAB 显色剂对 NC 膜避光反应 10～15min,蒸馏水终止反应。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 EmⅡ/3 基因



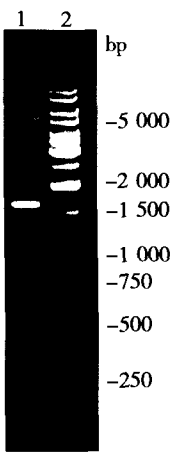
1. EmⅡ/3 的 PCR 产物 2. DNA marker

图 1 EmⅡ/3 PCR 扩增产物鉴定

以 pCD-EmⅡ/3 为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR 可扩增出 EmⅡ/3 基因,在 1 750bp 左右可见扩增的目的条带,见图 1。扩增的目的条带送上海生工公司测序发现其长度为 1 759bp,序列分析表明其序列与预期的序列完全相同。

2.2 重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 的酶切鉴定

重组质粒经 *BamH* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切后产生约 4.9×10^3bp 的载体片段和 1 750bp 左右的目的基因片段,见图 2。

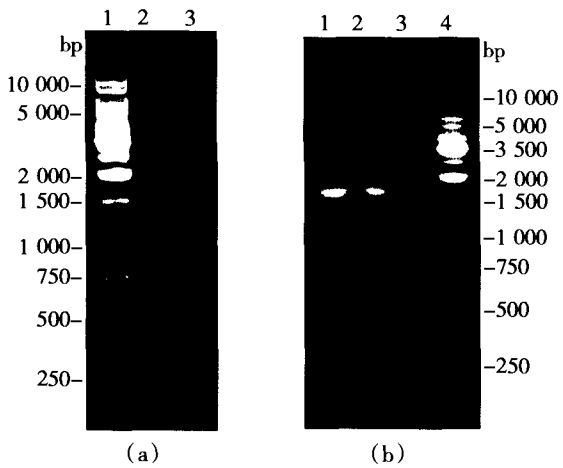


1. pGEX-EmⅡ/3 的双酶切鉴定;2. DNA marker

图 2 重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 的双酶切鉴定

2.3 rBb-EmⅡ/3 疫苗的鉴定

将从具有氨苄青霉素抗性的 rBb 中抽提的重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 进行双酶切,得到 4.9×10^3bp 的载体片段和 1 750bp 左右的插入基因片段,以该重组质粒为模板进行 PCR,可扩增出 1 750bp 左右的目的基因片段,酶切下来的插入的片段和 PCR 扩增产物均与 EmⅡ/3 基因的 PCR 产物大小相一致,见图 3。



(a) rBb 的双酶切鉴定电泳图; 1. DNA marker; 2. pGEX-1λT 的双酶切鉴定; 3. 从 rBb 中抽提的pGEX-EmⅡ/3 的双酶切鉴定; (b)rBb 的 PCR 鉴定电泳图。1～3. PCR 产物; 4. DNA marker

图 3 rBb 的双酶切鉴定(a)和 PCR 鉴定(b)

2.4 重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

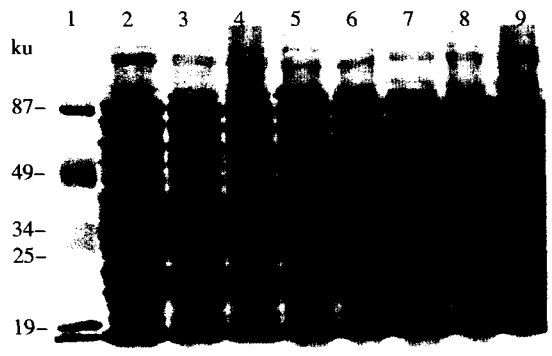
SDS-PAGE 蛋白电泳结果显示 pGEX-EmⅡ/3 重组质粒在 BL21 中能高效表达 EmⅡ/3/GST 融合蛋白。其分子量与预期分子量大小相符,约 92ku。用图像软件系统对凝胶上的蛋白带进行分析,EmⅡ/3/GST 融合蛋白占全菌总蛋白的 22%,且在 IPTG 诱导 3～5h 蛋白表达量最高。而未用 IPTG 诱导的含重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 的 BL21 无相应的目的蛋白条带,见图 4。

2.5 Western-blot 分析

诱导菌表达的 EmⅡ/3/GST 融合蛋白与活动性泡球蚴病鼠血清反应后,在分子量约为 92ku 处产生一特异反应带,未诱菌无此特异条带,见图 5。

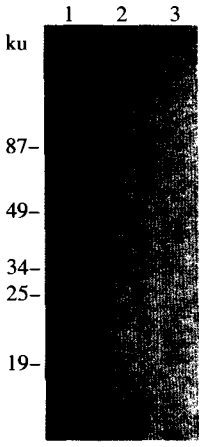
3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com



1. 蛋白标志物；2. 未经 IPTG 诱导的 BL21(pGEX-EmⅡ/3)；3～9. 分别为 IPTG 诱导 1、3、5、7、9、11 和 13h 的 BL21(pGEX-EmⅡ/3)

图 4 pGEX-EmⅡ/3 在大肠埃希菌 BL21 中表达的 SDS-PAGE 鉴定



1. 蛋白标志物；2. 重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 诱导表达产物；3. 未诱导的 pGEX-EmⅡ/3 对照

图 5 pGEX-EmⅡ/3 在大肠埃希菌 BL21 中表达产物的 Western blot 分析

Bb 是人和哺乳动物回肠末端及大肠内最主要的生理性菌群，是一种益生菌，具有抗菌、抑瘤、免疫调节和营养等多个方面的作用，目前临床上主要用于肠道疾病和肝脏疾病的辅助治疗[5]。现已报道有表达内皮抑素(Endostatin)基因和胞嘧啶脱氨酶(Cytosinedeaminase，CD)基因的双歧杆菌疫苗[6～9]，将它们用于肿瘤的防治均已取得了较好的治疗效果。重组双歧杆菌疫苗具有许多优点：所表达的靶抗原不需纯化，可直接用于免疫接种，免去了蛋白质后处理的复杂工序；单次接种后即可诱导机体产生针对靶抗原的免疫反应；运用分子生物学手段，通过对不同靶抗原的剪切和拼接，可使新型疫苗理想化；双歧杆菌本身作为一种益生菌，可提高宿主的免疫力；它价格低廉，易于保存，适于大量生产。

为了将外源 DNA 有效引入双歧杆菌，需构建大肠埃希菌－双歧杆菌穿梭表达载体，本研究所采用的大肠杆菌－双歧杆菌穿梭表达载体 pGEX-1λT 含有双歧杆菌复制起点、大肠杆菌复制起点、1 个多克隆位点和 1 个氨苄青霉素抗性基因，在多克隆位点上游有 1 个 GST 基因的一个片段，融合位点上有特异蛋白酶水解位点，方便 GST 的去除。在 GST 上游有 1 个启动子 Ptac，该启动子为在大肠杆菌中具有功能的 trp-lac 杂合启动子，其 -20 区上游转录起始点的 DNA 序列来源于 trp 启动子，其 -20 区下游的 DNA 序列来源于 lac UV5 启动子。Tac 启动子比去阻遏的母本 lac UV5 启动子有效地提高转录速率大约 11 倍，比在没有 trp 抑制子存在的 trp 启动子转录速率大约提高 3 倍(Deboer,et al,1983)。大肠杆菌中的 tac 启动子易于被 RNA 聚合酶识别而启动外源基因的表达、可用 IPTG 来控制外源基因的表达。该质粒使重组 DNA 在大肠埃希菌中操作，然后转化双歧杆菌，通过自动复制或同源整合与基因组进行基因交换，在双歧杆菌中稳定表达外源基因。

Vogel 等(1988 年)用 AE 患者血清筛选 Em 原头蚴 λgt11 cDNA 文库，得到一个阳性克隆Ⅱ/3，其表达产物为 EmⅡ/3，可降解为 31 和 33ku 的 2 种蛋白质。免疫荧光显示 EmⅡ/3 蛋白位于 Em 原头蚴的生发层和育囊囊壁上，与泡球蚴的生长密切相关。本试验采用 pCD-EmⅡ/3 作为扩增 EmⅡ/3 的模板，该重组质粒中 EmⅡ/3 基因长度为 1 760bp[4]，扩增出的 EmⅡ/3 预期产物长度为 1 759bp，表达 65ku 的蛋白质，该蛋白具有较高的遗传学稳定性、较强的免疫原性和较好的表面暴露性，适合作为泡球蚴病疫苗研究的候选分子[10,11]。序列分析发现，EmⅡ/3 基因的序列与预期的序列(1 759bp)完全相同，表明作者成功的克隆出 EmⅡ/3 基因。将 EmⅡ/3 基因定向克隆入穿梭表达载体pGEX-1λT，构建重组质粒 pGEX-EmⅡ/3，双酶切鉴定证实 EmⅡ/3 基因成功插入 pGEX-1λT 中。将重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 用电穿孔法转化 Bb，构建重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗，从具有氨苄青霉素抗性的 rBb 中抽提的质粒进行双酶切获得 1 750bp 左右的插入片段，并以该重组质粒为模板行 PCR 能够扩增出 1 750bp 左右的基因片段，提示作者成功构建了重组 Bb-EmⅡ/3 疫

维普资讯 http://www.cqvip.com

苗。

实验采用的穿梭表达载体 pGEX-1λT 含有 GST 基因，可将外源基因表达为 GST(分子质量单位为 26ku)的融合蛋白，表达效率高，操作简便。GST 分子量大，结构复杂，免疫动物制备抗体时，免疫原性强，用于基础免疫更有利于激发特异性回忆反应[12]。将重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 转入 BL21 中，用 IPTG 诱导表达，表达产物经 SDS-PAGE 电泳，在分子质量单位约为 92ku 处有目的蛋白条带，与预期表达蛋白大小(65+1+26=92ku)相符；而未诱导的 BL21 无目的蛋白条带，可能是表达的目的蛋白较少，导致 SDS-PAGE 不能检测。图像软件系统分析发现，EmⅡ/3/GST 融合蛋白占 BL21 全菌总蛋白的 22%，且在 IPTG 诱导 3～5h 蛋白表达量最高，提示重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 能在 BL21 中高效表达，不同的诱导时间蛋白表达效率不同。Western blot 分析发现 BL21 中表达的 EmⅡ/3/GST 融合蛋白可被泡球蚴病鼠血清特异识别，提示 BL21 中表达的重组抗原能够正确折叠，保持着具有活性的免疫功能区，具有特异抗原性，为多房棘球绦虫重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗的开发利用提供了坚实的理论基础。

参 考 文 献

[1] 王昌源，陈雅棠，余登高，等.多房棘球绦虫 ELP 重组蛋白疫苗免疫 BALB/c 小鼠引起的免疫应答[J]. 免疫学杂志，2003；19(4)：285-288，292.

[2] 李文桂，王 鸿，朱佑明.多房棘球绦虫重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗免疫小鼠后 IgG 及其亚类和 IgE 的动态观察[J]. 中国病原生物学杂志，2007；2(3)：197-199.

[3] Missich R，Sgorbati B，Donald JL，et al. Transfection of Bifidobacterium longum with pRM2，a constructed Escherichia coli-Bifidobacteria longum shuttle vector[J]. Plasmid，1994；32(2)：208-211.

[4] 王昌源，陈雅棠，黄爱龙，等.多房棘球绦虫 elp 基因在真核细胞 COS7 中的表达[J]. 中国寄生虫病防治杂志，2003；16(1)：38-42.

[5] 李文桂，陈雅棠.双歧杆菌生物学作用研究进展[J]. 地方病通报，2006；21(1)：85-88.

[6] Yazawa K，Fujimori M，Amino J，et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy：selective localization and growth in hypoxic tumours[J]. Cancer Gene Ther，2000；7(2)：269-274.

[7] 徐根兴.转人实体瘤内皮抑制因子(Endostatin)基因双歧杆菌的方法[J]. 发明专利公告，1999；15(20)：20.

[8] 韩庆旺，徐根兴，徐叶芬，等.大肠杆菌－双歧杆菌穿梭表达载体的构建及内皮抑素基因的表达[J]. 生物技术通讯，2006；17(1)：18-21.

[9] 郭志英，易 成，王树人，等.婴儿双歧杆菌胞嘧啶脱氨酶肿瘤靶向性基因治疗系统的构建[J]. 中国肺癌杂志，2004；7(2)：95-98.

[10] Vogel M，Gottstein B，Muller N，et al. Production of a recombinant antigen of echinococcus multilocularis with high immunodiagnostic sensitivity and specificity[J]. Mol Biochem Parasitol，1988；31(2)：117-125.

[11] Felleisen R，Gottstein B. Comparative analysis of full-length antigenII/3 from Echinococcus multilocularis and E. granulosus[J]. Parasitol，1994；109(2)：223-232.

[12] Lacham-Kaplan O，Chy H，Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes[J]. Stem Cells，2006；24(2)：266-273.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 651 页)

saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials[J]. Cancer Detect Prev，2004；28(6)：426-432.

[2] Zu X，Tang Z，Li Y，et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis[J]. BJU Int，2006；98(5)：1090-1093.

[3] Suzuki K，Morita T，Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Int J Urol，2005；12(2)：152-158.

[4] 祖雄兵，齐 琳，叶章群，等. VEGF-C 在膀胱移行细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 临床泌尿外科杂志，2004；19(9)：551-554.

[5] He SY，Qian ZY，Tang FT，et al. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms[J]. Life Sci，2005；77(8)：907-921.

[6] Garcia-Olmo DC，Riese HH. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin，a carotenoid from saffron (Crocus sativus L.)：an experimental study in the rat[J]. Nutr Cancer，1999；35(2)：120-126.

[7] Escribano J，Alonso GL，Coca-Prados M，et al. Crocin，safranal and picrocrocin from saffron (Crocus sativus L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro[J]. Cancer Lett，1996；100(1-2)：23-30.

[8] Saleh M，Stacker SA，Wilks AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence[J]. Cancer Res，1996；56(2)：393-401.

[9] Yang SX，Chen JH，Jiang XF，et al. Bian XW.Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun，2005；335(2)：523-528.

[10] Zhu Z，Rockwell P，Lu D，et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced receptor activation with anti-kinase insert domain-containing receptor single-chain antibodies from a phage display library[J]. Cancer Res，1998；58(15)：3209-3214.

(责任编辑：关蕴良)