

慢型克山病患者血清蛋白质双向凝胶电泳图谱分析*

孙玉晓¹, 朱延河², 朱建宏¹, 牛小麟^{1△}, 阎超¹, 杨光¹, 林琳¹

1. 西安交通大学医学院第二附属医院 心内科 地方病科 (西安 710004);

2. 西安交通大学 环境与疾病相关基因教育部重点实验室 医学院地方病研究所 (西安 710061)

【摘要】 目的 分析克山病(KD)患者差异表达的血清蛋白质。**方法** 以慢型 KD 和正常血清标本为研究对象,利用双向凝胶电泳(2-DE)分离 KD 和健康人血清蛋白质,银染显色,PowerLook2100XL 扫描仪(Umax)透射扫描获取图像,ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件分析图像。并通过与 ExPASy-SWISS-2DPAGE 数据库关联,推测 KD 相关的差异蛋白。**结果** 建立了稳定的慢型 KD 和健康人血清蛋白质 2-DE 图谱,分别检测到 808 和 814 个蛋白质点,匹配率 96.5475%。软件分析显示 2 组样本共有 44 个差异蛋白质点,11 个仅在 KD 组血清中表达,12 个仅在正常血清组出现,21 个为共有蛋白但在表达量上存在差异(KD 组 14 个上调,7 个下调,差异倍数 ≥ 3 倍, $P < 0.01$)。将差异蛋白与 ExPASy-SWISS-2DPAGE 数据库关联,在匹配值范围内出现的 353 个蛋白中,仅比对照 KD 2-DE 图谱胶内编号为 1177 的蛋白点在属性上与数据库中的 P02774 2-D0004T6 名为维生素 D 结合蛋白(VDBP)匹配度最高,推测编号为 1177 的差异蛋白是 VDBP。**结论** KD 患者与正常人血清蛋白质组存在明显差异。推测 VDBP 可能通过炎症免疫反应途径参与了 KD 的心肌损伤。

【关键词】 克山病 血清 蛋白质组学 2-DE(双向凝胶电泳)

Two-dimensional Gel Electrophoresis Map of Serum Proteins in Patients with Chronic Keshan Disease SUN Yu-xiao¹, ZHU Yan-he², ZHU Jian-hong¹, NIU Xiao-lin^{1△}, YAN Chao¹, YANG Guang¹, LIN Lin¹. 1. Department of Cardiology and Endemic Disease Medicine, the Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Institute of Endemic Disease, Key Laboratory of Gene Related to Diseases, Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China
△ Corresponding author, E-mail: niuxl@mail. xjtu. edu. cn

【Abstract】 Objective To identify the different serum proteins expressed in patients with Keshan disease (KD). **Methods** Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was performed with serum samples from the patients with chronic KD and healthy controls to separate serum proteins. The gels were stained by silver and scanned by Umax scanner. The data were analyzed by ImageMaster 2D software. KD related proteins were identified through searching the ExPASy-SWISS-2DPAGE database. **Results** Stable two-dimensional gel electrophoresis maps were established for serum samples of KD patients and healthy controls. A total of 808 and 814 protein spots were observed in KD patients and healthy controls, respectively. The two maps had 96.5475% identical protein spots and 44 differentially expressed protein spots. Eleven protein spots were expressed exclusively in KD patients and 12 protein spots only appeared in healthy controls. About 21 proteins were expressed in both groups but varied in quantities (14 proteins were over-expressed by more than 3 times and 7 proteins were under-expressed by more than 3 times in KD patients, $P < 0.01$). Among the 353 protein spots matched with the ExPASy-SWISS-2DPAGE databank, No. 1177 protein appeared in the KD patient was found to have the closest match with P02774 2-D0004T6 known as vitamin D binding protein (VDBP). **Conclusion** There is a significant difference in serum protein expression between KD patients and normal people. VDBP might play a role in cardiac muscle damage via inflammatory immune reactions.

【Key words】 Keshan disease Serum Proteomics Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

克山病(Keshan disease, KD)是一种病因不明的地方性心肌病(endemic cardiomyopathy,

ECD)^[1]。病区遍及全国 16 个省、自治区,威胁着 1.33 人口的健康与生命^[2]。近年来,以慢型和潜在型为主要临床类型^[3],慢型 KD 病死率高,5 年生存率一般不足 50%^[4]。除病因不明外,尚缺乏早期诊断标志物及针对性的病因学预防措施,因此,寻找

* 国家自然科学基金(No. 30771862)和国家重点基础研究发展规划(No. 2006BC503802)资助

△ 通讯作者, E-mail: niuxl@mail. xjtu. edu. cn

KD 诊断标志物对 KD 的早期诊断及发病机制的探讨具有重要意义。蛋白质组学技术为此提供了研究的平台。鉴于目前国内外鲜见 KD 蛋白质组学的研究报道,本研究运用双向电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术,比较分析 KD 与正常人血清蛋白质组表达的异同,为后续 KD 的定量蛋白质组学研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 按 KD 诊断标准^[5](WS/T 210-2011)选取陕西省黄陵县病区 3 例上世纪 60 年代 KD 爆发流行期间确诊为 KD 的幸存者为研究对象,设为慢型 KD 组,均为男性,年龄(60 ± 6)岁,心功能均为 NYHA IV 级;X-Ray 胸片心胸比均 ≥ 0.60 ;超声心动图示中重度心脏扩大、射血分数(EF) $<40\%$ 、E 峰速度/A 峰速度(E:左室舒张早期心室充盈速度最大值;A:左室舒张晚期心室充盈速度最大值) <1.2 ;3 例患者均有心律失常:为完全性右束支传导阻滞(RBBB),ST-T 改变,频发室性早搏,房颤改变。健康志愿者 3 例取自西安交通大学第二附属医院体检科,为非病区西安市健康男性,年龄(60 ± 4)岁,检查无异常,设为对照组。本研究经西安交通大学第二附属医院伦理委员会批准,所有参与研究的患者和健康志愿者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂和仪器 ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit (德国默克公司, No. 122642), 苯甲基磺酰氟(PMSF)、硝酸银、两性电解质(Amersham 公司, USA), 三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)购自 GibcoBRL 公司, 十二烷基磺酸钠(SDS)、甲叉双丙烯酰胺、N,N,N,N-四甲基乙烯二胺(TEMED)、溴酚蓝(Sigma 公司, USA), IPG 缓冲液(pH4~7)、固相 pH 梯度胶条(pH4~7, 18 cm)、覆盖液(Amersham Pharmacia 公司, USA)。IPG phor 等电聚焦仪(Protean IEF cell)、垂直电泳系统、扫描仪(Umax, power2look 2100XL)、凝胶图像分析软件 ImageMaster 2D Platinum 5.0(Amersham Biosciences 公司, USA), 紫外分光光度计(Amersham 公司, USA)。

1.2 实验步骤及方法

1.2.1 血清采集 晨起安静状态下抽取空腹肘静脉血 5 mL 入清洁干燥试管, 4℃ 放置 2 h, 4000 r/min 离心血清 15 min, 移液器小心吸取上层清亮透明血清分装到硅烷化 EP 管, 保存液氮罐中, 后置入

-80℃ 冰箱, 同法处理对照组血清。

1.2.2 血硒含量测定 全血硒含量测定采用 2,3-二氨基奈荧光分光光度法。

1.2.3 2-DE 样品制备 根据默克公司试剂盒(No. 122642)操作手册所列步骤进行。将每个血清样本 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 使用吸附柱子亲和法去除 KD 组及对照组血清样品中高丰度蛋白质, 制作标准曲线并测定每个样本的蛋白浓度, 得到可用做 2-DE 的富集了低丰度蛋白的血清。改良的 Bradford 法检测蛋白, $R^2 = 0.9946$, 表明蛋白含量测定准确可靠。样品 -80℃ 保存。

1.2.4 双向凝胶电泳 参考文献^[6]和仪器操作手册进行。每张电泳图各重复 3 次。本实验使用的是非线性、18 cm pH4~7 的 IPG 商品预制胶条进行等电聚焦, 蛋白质上样量为 150 μ g, 硝酸银染色。
① IPG 干胶条重水化: 取 150 μ g 蛋白质的血清样品加入上样缓冲液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol/L Tris, 50 mmol/L DTT, 2 mmol/L TBP, 0.2% IEF buffer pH3~10, 痕量溴酚蓝)充分混合至总体积 350 μ L。
② 第一向固相 pH 梯度等电聚焦(IEF): 被动水化 12~16 h, 泡涨后将持胶槽放入等电聚焦仪电极板上, 等电聚焦按设定的程序自动进行。50 V 4 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 聚焦到 8000 V 1~2 h。
③ 胶条平衡: 等电聚焦之后, IPG 胶条移至平衡缓冲液。先在平衡液 A (6 mol/L 尿素、2% SDS、pH8.8 的 0.05 mol/L Tris-HCL、20% 甘油、2% DTT) 平衡 15 min, 再在平衡液 B (以 2.5% 碘乙酰胺替换平衡液 A 中 2% DTT) 平衡 15 min。
④ 垂直板 SDS-PAGE 电泳: 将固定结合好胶条的两套玻璃模具插入 Ettan Dalt II System 电泳仪的相应槽内, 实验参数设置为前 30 min 每块胶 2.5 W, 之后每块胶 15 W, 至溴酚蓝到达胶下沿(约需 5~7 h)。

1.2.5 凝胶硝酸银染色 2-DE 电泳后凝胶采用改良的兼容质谱的硝酸银染色。将凝胶置于脱色摇床固定液中至少 3 h, 敏化 30 min, 双蒸水洗脱 3 次, 每次 10 min, 再置于银染液中 30 min, 双蒸水洗脱 2 次, 每次 1 min, 显色液中显色直至蛋白点完全呈现为止。10 min 后双蒸水洗脱 3 次, 每次 5 min, 置于保存液中, 每 30 min 更换一次保存液。

1.2.6 凝胶图像采集与分析 PowerLook2100XL 扫描仪(UMAX)透射扫描图像扫描, 以 ≥ 300 dpi 的分辨率保存图像文件 TIFF 格式。再将 tiff 格式文件导入 ImageMaster2D Platinum 5.0 软件系统进行

分析,主要包括图像加工、背景消减、斑点检测与定量、凝胶匹配、数据分析,蛋白质表达量相差 3 倍以上视为显著差异蛋白质点。

1.2.7 推测差异蛋白名称 根据差异蛋白的等电点(pI)与相对分子质量(MM)的分布,人工搜索 ExPASy-SWISS-2DPAGE 数据库,推测与之匹配的蛋白名称。

2 结果

2.1 血硒含量测定结果

慢型 KD 患者血硒为(0.8 ± 0.2) $\mu\text{mol/L}$,对照组为(1.2 ± 0.2) $\mu\text{mol/L}$ ($F = 4.882, P < 0.001$),健康对照组血硒明显高于慢型 KD 组。

2.2 SDS-PAGE 鉴定试剂盒富集血清低丰度蛋白效果

KD 组与健康对照组处理前及 Merck™ ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit (No. 122642)处理后的血清(40 μL 层析)蛋白一维电泳比较。通过试剂盒亲和层析柱吸附血清中 80% 以上高丰度蛋白质,血清中的高丰度蛋白质明显减少,低丰度蛋白得到了良好富集,达到了 2-DE 的实验要求标准。见图 1。

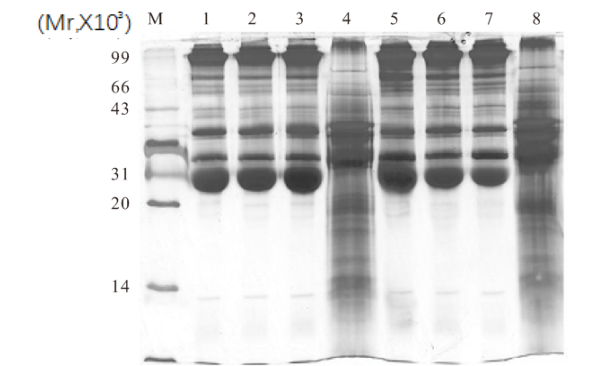


图 1 SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度

Fig 1 Using SDS-PAGE to identify protein purity

M; Marker; 1, 2, 3; Healthy human crude serum; 5, 6, 7; Chronic KD patients crude serum; 4; After removal of high abundance protein of healthy people mixed serum; 8; After removal of high abundance protein of chronic KD patients mixed serum

2.3 KD 和正常人血清 2-DE 图谱的建立

通过上述方法获得了分辨率较高、重复性及稳定性较好的 KD 患者与正常健康人的血清双向凝胶电泳图谱,见图 2。

2.4 KD 和正常人血清 2-DE 图谱的差异分析

2-DE 图谱经 ImageMaster-2D 软件分析,正常

对照组血清蛋白质点数为 814 个,KD 组为 808 个,匹配率为 96.5475%,图谱分布大致相似。进行蛋白点匹配后,2 张 2-DE 图谱上一共找到差异蛋白质点 44 个,其中 21 个为共有蛋白,但在表达量上存在差异(KD 组 14 个上调、7 个下调,差异倍数 ≥ 3 倍, $P < 0.01$);另外 23 个蛋白点为有和无之间的差异(11 个仅在 KD 组血清中表达,12 个仅在正常血清组出现)。见图 3、表 1 及表 2。

2.5 差异蛋白与 ExPASy-SWISS-2DPAGE 数据库的关联

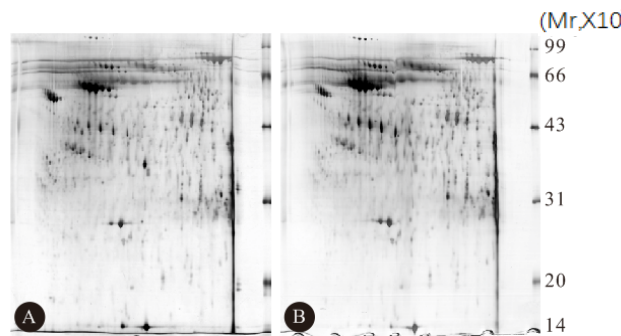


图 2 健康人血清与慢型 KD 组血清 2-DE 图谱

Fig 2 Two-dimensional gel electrophoresis of serum samples from chronic KD patients and healthy controls

A: The 2-DE map of healthy human serum; B: The 2-DE map of chronic KD patient serum

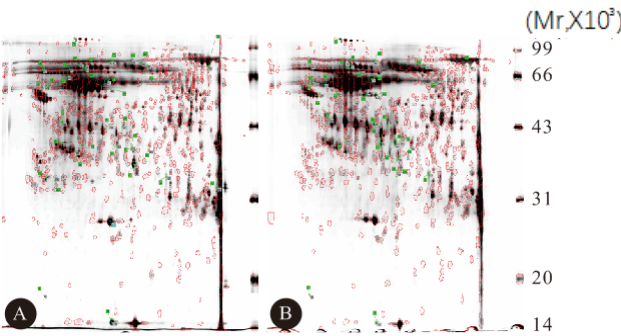


图 3 健康人血清与慢型 KD 组血清的差异 2-DE 图谱

Fig 3 Two-dimensional gel electrophoresis of serum samples from chronic KD patients and healthy controls

A: Healthy human serum; B: Chronic KD patient serum. Red is the matching points of proteins; Green is up or down regulated (by at least three times) expression of protein with or without (chy) proteins

根据差异蛋白的 pI 与 MM 的分布,人工搜索 ExPASy-SWISS-2DPAGE (<http://www.expasy.ch/ch2d/>)数据库,推测与之匹配的蛋白质。设定搜索条件:物种为 Homo sapiens,图谱为 2DPAGE Human plasma,pI 为 4.0~7.5,MM 为 $30 \times 10^3 \sim 112 \times 10^3$ 。在 pI 与 MM 数值匹配范围内,共出现

353 个蛋白,其中与慢型 KD 2-DE 胶内编号 1177 的蛋白点属性相似度匹配较高的蛋白质为 P02774 2D-0004T6,其 pI=5. 16,MM=53772,其名称:维生素 D 结合蛋白(VDBP),与健康人血清相比下调 4. 1 倍。

表 1 仅在慢型 KD 患者血清中表达的蛋白质点信息
Table 1 Proteins only detected in serum samples of patients with chronic Keshan disease

No.	SpotID	pI	MM	Area
1	235	5. 26670	71077	4. 30110
2	306	6. 40458	62939	7. 94987
3	327	4. 73426	61780	3. 82798
4	398	5. 35401	56824	4. 65953
5	400	4. 92176	57532	1. 83514
6	409	4. 66126	56882	3. 49106
7	422	5. 48569	55893	11. 1112
8	577	5. 50716	43988	6. 68821
9	653	5. 86069	40254	9. 88536
10	786	5. 80200	35023	10. 3513
11	1023	6. 21422	77296	2. 47313

pI: Isoelectric point; MM: Molecular mass
表 2 慢型 KD 组血清明显上调和下调的蛋白质点信息

Table 2 Significantly (> 3 folds) up-regulated or down-regulated proteins in patients with chronic Keshan disease

No. of gel	pI	MM	Type of differential expression
3	4. 94413	111188	Up-regulated 3. 94320
201	5. 60559	78282	Up-regulated 3. 77947
209	6. 16942	59771	Up-regulated 3. 14072
354	5. 40223	63608	Up-regulated 3. 27382
416	4. 52793	60688	Up-regulated 3. 45343
417	4. 56425	60621	Up-regulated 4. 80553
646	4. 76955	44468	Up-regulated 3. 53218
670	5. 43715	43096	Up-regulated 6. 28482
671	5. 63128	43096	Up-regulated 3. 01362
770	5. 02374	39844	Up-regulated 5. 48713
780	5. 54190	39571	Up-regulated 7. 93152
793	5. 75279	39233	Up-regulated 3. 91273
803	5. 75559	38786	Up-regulated 3. 72354
804	6. 00140	38653	Up-regulated 3. 78058
147	5. 44693	81000	Down-regulated 4. 95571
228	6. 84637	75397	Down-regulated 3. 27880
257	4. 48324	73366	Down-regulated 8. 29160
872	5. 78492	36354	Down-regulated 4. 48325
1160	4. 46089	17473	Down-regulated 13. 64010
1173	4. 00000	14000	Down-regulated 5. 81126
1177	5. 17396	53781	Down-regulated 4. 09614

pI,MM: The same as that in table 1

3 讨论

KD 作为一种地方性心肌病,其病因及发病机制至今仍未查明。已有研究表明 KD 与多因素(环境、免疫、病毒感染)^[7]、易感基因、基因-环境交互作用等关系密切^[8],传统的分子生物学对探索克山病病因及发病机制作出了巨大贡献,但其现有手段仍难以对 KD 多种致病因素作出进一步的分析。后基

因组时代研究生命科学的各种先进组学技术为我们揭示 KD 分子发病机制提供了崭新的思路,尤其是蛋白质组学方法,其具有的高通量、高重复性及高灵敏性等特点,已成为探讨人类疾病发病机制和筛选早期诊断标志物的强有力工具^[9,10]。

目前,蛋白质组学技术已广泛应用于心血管疾病发病机制及生物标志物的研究。如 Banfi 等^[11]利用 2-DE 结合质谱比较心衰及无心衰患者发现 30 种蛋白质表达出现上调或下调,包括细胞膜上与信号转导有关的微管、酶、骨架蛋白等。魏英杰等^[12]应用 2DE-DIGE 技术筛选致心律失常性右心室心肌病引起的心力衰竭,筛选出 5 个差异表达的蛋白质,这 5 个差异蛋白主要为心肌细胞的骨架蛋白或参与能量代谢和应激保护反应的蛋白。这些标志物可能与心力衰竭发生的分子机制相关,并可能用于疾病的分层、判断预后及指导个性化治疗。以上为我们研究 KD 提供了可借鉴的方法。

本研究运用 2-DE 的研究方法,通过与正常人血清和 KD 患者血清蛋白质组电泳图谱进行比较,发现 44 个蛋白质点在表达丰度、表达谱上有差异,推测在 KD 病理生理过程中血清中的某些蛋白成分发生了改变。通过将差异蛋白质与 SWISS-2DPAGE 2-DE 数据库关联,设定搜索条件,依据属性匹配进行进一步分析,在 pI 与 MM 数值匹配范围内,共出现 353 个蛋白,其中与慢型 KD 2-DE 胶内编号 1177 的蛋白点属性相似度匹配最高的蛋白质为 P02774 2D-0004T6,其 pI=5. 16,MM=53772,推测该蛋白质为 VDBP。

VDBP 是一种能特异性结合维生素 D(Vit D)的蛋白质。其主要是运输 Vit D 及其衍生物,在维持血清 Vit D 的含量、调整 Vit D 生物利用度、Vit D 活性、末端组织对 Vit D 的反应中起重要作用^[13]。此外,VDBP 还通过多种方式参与炎症反应^[14-16]。

近年研究发现,大部分心力衰竭患者 Vit D 处于低水平^[17]。Vit D 治疗能改善心衰动物模型的心功能并能降低其死亡率和发病率^[18]。还有研究发现,Vit D 具有抗炎及调节免疫的功能,尤其是 1, 25-(OH)2-D3 能下调多种免疫细胞内炎症因子的表达诸如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素 1, 6,8(IL-1, IL-6, IL-8)等^[19]。本研究也发现 KD 患者血硒浓度低于健康人群,推测由于慢型 KD 心衰患者长期存在营养不良,其血浆中 VDBP 水平不足,而且 KD 患者血硒浓度长期处于低水平状态,氧

化应激增强,氧自由基生成增多,在致病因素作用下,易发生炎症及免疫反应,加之已损伤心肌组织释放肌动蛋白(actin)到血浆与 VDBP 结合,加剧 VDBP 的消耗,使其浓度进一步降低,促进未结合 VDBP 的 actin 形成微血栓,进而又促进心肌及血管内皮的损伤,导致心肌及胞外基质重构,心肌纤维化,收缩功能下降,终至失代偿。但其机制原理仍有待于进一步研究验证。

参 考 文 献

- 1 朱延河,刘作功,郭 雄等.卡托普利对慢型克山病患者长期临床疗效的影响. 四川大学学报(医学版),2008;39(1):152-153.
- 2 <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/wsb/>,2011 年中国卫生统计年鉴.
- 3 相有章.克山病流行现状与病因研究近况. 中国地方病学杂志,2005;24(4):463-465.
- 4 相有章.加强我国慢型克山病患者的治疗与管理. 中国地方病学杂志,2006;25(4):357-358.
- 5 中华人民共和国卫生部 2011-4-26 发布的 WS/T 210-2011 克山病诊断.
- 6 Gorg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis,2000;21(6):1037-1053.
- 7 魏 瑾,牛小麟,董 新等.HLA-DRB1 基因多态性与克山病及其核心家系的关系研究. 中华医学遗传学杂志,2007;24(1):91-93.
- 8 雷 聪,牛小麟,魏 瑾等.克山病发病与谷胱甘肽过氧化物酶一 1 基因多态性的关系研究. 中华预防医学杂志,2010;44(7):617-621.
- 9 朱 文,邓幼林,周清华等.人高、低转移大细胞肺癌细胞株双向凝胶电泳图像分析. 中国肺癌杂志,2005;8(1):1-7.

- 10 Yang SY, Xiao XY, Zhang WG, *et al.* Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer. BMC Cancer,2005;5:83.
- 11 Banfi C, Brioschi M, Wait R, *et al.* Proteomic analysis of membrane microdomains derived from both failing and non-failing human hearts. Proteomics,2006;6(6):1976-1988.
- 12 魏英杰,胡盛寿,黄银霞等.双向荧光差异凝胶电泳技术在心脏病蛋白质组学研究中的应用. 中国循环杂志,2008;23(4):297-300.
- 13 Wilson PW, Cupples LA, Meigs JB, *et al.* Genome scan for impaired glycemic status: results from the Framingham Heart Study. Diabetes,1997;46(Supple 1):76A.
- 14 Berger D, Beger HG. Evidence for endotoxin binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. Clin Chim Acta,1987;163(3):289-299.
- 15 Kew RR, Mollison KW, Webster RO. Binding of Gc-globulin (vitamin D binding protein) to G5a or C5a des Arg is not necessary for co-chemotactic activity. J Leukoc Biol,1995;58(1):55-58.
- 16 Yamamoto N, Kumahiro R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macro-phage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. J Immunol,1993;151(5):2794-2802.
- 17 仲晓慧,刘艳花,黄晓莉.孕期营养指导和血糖监测的工作体会. 中国妇幼保健,2007;22(6):722-723.
- 18 吴向华,于 珊,段明英.孕期个体化营养指导对妊娠结局的影响. 中国妇幼保健,2007;22(4):454-455.
- 19 Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. J Mol Med (Berl),2010;88(5):441-450.

(2012-11-07 收稿,2013-01-18 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 351 页)

- 4 Mocellin S. Targeting death receptors to fight cancer: from biological rationale to clinical implementation. Curr Med Chem, 2010;17(25):2713-2728.
- 5 Wizeorek J, Holland P, Graves J. Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. Clin Cancer Res, 2010;16(6):1701-1708.
- 6 侯登勇,张英起,韩 苇等. TRAIL 与导向肽融合基因的克隆、表达及其表达产物的生物学活性. 中国生物制品学杂志, 2005;18(4):277-280.
- 7 Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. Gene Ther,2000;7(1):20-23.
- 8 Wiznerowicz M, Trono D. Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. Trends Biotechnol, 2005;23(1):42-47.
- 9 Kim CY, Jeong M, Mushiaki H, *et al.* Cancer gene therapy using a novel secreted trimeric TRAIL. Gene Ther,2006;

13(4):330-338.

- 10 Xu K, Ma H, McCown TJ, *et al.* Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. Mol Ther,2001;3(1):97-104.
- 11 纪文婷,许严伟,张霄翔等.肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的原核表达、纯化及抗肿瘤活性研究. 安徽医药,2008;12(4):297-299.
- 12 张汝刚,房殿春,罗元辉.端粒酶逆转录酶 RNA 干扰增加肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体活性. 中华消化杂志,2006;26(7):482-483.
- 13 廖前进,周钰娟. TRAIL 诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡. 南华大学学报,2010;38(5):617-619.
- 14 周 莉,丰有吉.重组人 TRAIL 促卵巢癌细胞凋亡作用的研究. 中国癌症杂志,2005;15(3):268-270.

(2012-10-30 收稿,2013-02-22 修回)

编辑 余 琳