

携带 EGFP 基因的逆转录病毒载体的构建及初步应用

赵 宁, 郭中敏*, 陈系古

(中山大学实验动物中心, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】构建携带有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的逆转录病毒载体,观察 GFP 的表达情况以及对靶细胞生物特性的影响。【方法】以质粒 pEGFP-C1 为模板进行 PCR 反应,获得完整保留 pEGFP-C1 载体多克隆酶切位点(MCS)的 EGFP 基因片段,定向插入逆转录病毒载体 pLXSN,筛选出正确的重组逆转录病毒载体 pLXSN-EGFP,转染 PA317 包装细胞后获得具有感染能力的病毒颗粒,转染人多型性脑胶质瘤细胞 SW038-C2,通过荧光显微镜和流式细胞仪(FACS)观察 EGFP 做为报告基因在体外的表达情况、以及对靶细胞生物特性的影响。【结果】成功克隆携带有 EGFP 基因的逆转录病毒载体,该载体经包装细胞包装后可有效转染人多型性脑胶质瘤细胞 SW038-C2 并稳定表达,对靶细胞的生长无抑制。高表达 GFP 的靶细胞形态变得细长,FACS 检测约有 98% 的细胞表达 GFP,体外培养 6 个月荧光强度没有明显的衰减,而低表达 GFP 的靶细胞形态无变化,FACS 检测有 30% 细胞表达 GFP。【结论】使用 GFP 作为报告基因,检测到的病毒载体转染率比实际偏低,所构建的 pLXSN-EGFP 载体可在体外稳定表达,为再插入治疗用基因进行后续研究奠定基础。

关键词: EGFP 基因; 逆转录病毒载体; pLXSN-EGFP; 转染; SW038-C2 细胞

中图分类号: R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)02-0154-06

Construction and Preliminary Application of Retroviral Vector Carrying EGFP Gene

ZHAO Ning, GUO Zhong-min, CHEN Xi-gu

(Experimental Animal Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To construct the retroviral vector carrying enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene and to observe the expression of green fluorescent protein (GFP) in vitro and its effect on biological characteristics of target cells. 【Methods】EGFP gene fragment, which was ligated into the multiple cloning site (MCS) with pEGFP-C₁ vector preserved completely, was obtained through PCR reaction using pEGFP-C₁ plasmid as a template and directionally inserted into MCS of retroviral vector pLXSN. The right recombinant retroviral vector pLXSN-EGFP was selected to transfect packaging cell PA317 to gain virus particles with infection ability. Human glioblastoma mutiforme cells SW038-C2 were transfected. The expression of EGFP gene as reporter gene in vitro and its effect on the biological characteristics of target cells were observed by fluorescence microscope and fluorescence activated cell sorting (FACS). 【Results】The recombinant retroviral vector with EGFP gene was cloned successfully. Packaged by packaging cell PA317, the recombinant vector could transfect human glioblastoma mutiforme cells SW038-C2 effectively, express stably, and did not show inhibitory effect on the growth of target cells. Target cells with high expression of GFP became long and thin. FACS showed about 98% of these cells expressed GFP, and the intensity of the fluorescence did not decrease after culture in vitro for 6 months. The shape of target cells expressing low level GFP did not change and 30% of them expressed GFP was observed in FACS. 【Conclusions】The transfection rate of virus vector being detected is lower than actual results while GFP is used as reporter gene. The constructed vector pLXSN-EGFP can express stably in vitro, which are useful for future research for inserting another therapy gene in the vector.

Key words: enhanced green fluorescent protein gene; retroviral vector; pLXSN-EGFP; transfect; SW038-C2 cell

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(2): 154-159]

收稿日期: 2008-09-10

基金项目: 广东省重点攻关课题(522203045); 广东省博士启动基金(984058)

作者简介: 赵宁, 病理学硕士研究生; * 通讯作者: 郭中敏, 副教授, 硕士生导师, E-mail: zhongminguo@yahoo.com.cn

使用携带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因的转基因载体,用荧光显微镜和流式细胞仪 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 对载体的靶向性和转染效率及其在活体中的分布进行观察和检测^[1-2]是基因治疗研究中常用的方法^[3]。但是长久以来,对靶细胞中可检测到的 GFP 表达率能否完全体现载体转染效率的研究很少,而此对病毒载体有效性的评估非常关键。我们构建携带 EGFP 基因的逆转录病毒载体 pLXSN-EGFP,通过对不同基因表达水平的靶细胞生物学特性的观察检测,对 GFP 基因表达率与载体实际转染效率的关系进行评价。而且在基因治疗研究中,往往需要将目的基因和 GFP 基因共同插入病毒载体以达到二者双表达才能真实反映目的基因的表达程度、靶向性以及转染后在活体中的分布情况等^[4-5],如果能够成功构建完整保留 pEGFP-C₁ 多克隆酶切位点 (multiple cloning site, MCS) 的逆转录病毒载体 pLXSN-EGFP,则使后续再插入一个甚至多个治疗用基因共表达的操作变的简单可行,对以后的定量分析目的基因表达以及探讨有关治疗手段对肿瘤细胞侵袭和转移的影响等等奠定基础!

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 逆转录病毒载体 pLXSN、pEGFP-C₁ (美国 Clontech 公司)、大肠杆菌 DH5 α 、包装细胞 PA317、NIH3T3 细胞、人多型性胶质母细胞瘤细胞 SW038-C2 均由中山大学实验动物中心提供。

1.1.2 试 剂 RPMI-1640、DMEM (美国 Gibco 公司);限制性内切酶 *Bam*H I、*Bcl* I、*Hpa* I、*Tag* 酶、T4 连接酶 (大连宝生物公司);D L2000 Mark、 λ -EcoT14 I digest Mark (华美生物工程公司);QIAquick Plasmid Extraction Kit 质粒提取试剂盒、QIAquick Gel Extraction Kit DNA 胶回收试剂盒、脂质体 (美国 Gene 公司)

1.1.3 引物设计与合成 根据 Clontech 公司提供的 pEGFP-C₁ 载体序列,在 EGFP 基因读码框前后 (第 613 位至 1446 位碱基) 设计上下游引物 P₁ 和 P₂。并在上游引物 P₁ 序列中引入限制性内切酶 *Hpa* I 酶切位点。具体序列如下: P₁: 5'-AAGTT

AACATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'; P₂: 5'-AACC TCTACAAATGTGGTATGGCTG-3'; 目的基因整合情况 PCR 鉴定所用引物是在 EGFP 基因读码框中选取第 808 位碱基至第 1228 位碱基约 420 bp 大小的片段,序列如下: P'₁: 5'-ACCTACGGCGTGCA GTGCTTC-3'; P'₂: 5'-ACTGGGTGCTCAGGTAGTG GTTG-3' 引物由大连宝生物公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 携带有 EGFP 基因的重组逆转录病毒载体的构建 以质粒 pEGFP-C₁ 为模板进行 PCR 反应,获得连接有 pEGFP-C₁ 多克隆酶切位点的 EGFP 基因片段,限制性内切酶 *Hpa* I 及 *Bcl* I 酶切后,利用 *Bcl* I 和 *Bam*H I 为同尾酶的特性,定向插入经 *Hpa* I 和 *Bam*H I 双酶切的逆转录病毒载体 pLXSN 构建重组载体 pLXSN-EGFP,转化宿主菌后提取阳性克隆质粒 DNA 进行酶切、PCR 及 DNA 测序鉴定。

1.2.2 重组逆转录病毒载体包装细胞系的建立、病毒液的制备及滴度测定 取对数生长期 PA317 细胞接种在 6 孔板内,待细胞 70% ~ 80% 融合,加入脂质体-质粒混合物,饥饿培养 6 h 后更换成 RPMI1640 完全培养基,转染重组载体 48 ~ 72 h 后的包装细胞可更换含浓度为 400 μ g/mL G418 的 RPMI1640 完全培养液进行筛选培养,同时用未转染的 PA317 细胞做对照。以后每 3 ~ 4 d 更换 1 次筛选液,G418 的浓度最大可升至 800 μ g/mL。当对照组的细胞大部分死亡时,G418 的浓度可逐渐降至 150 ~ 250 μ g/mL 以维持筛选作用。约 10 ~ 20 d 后,可见有抗性克隆形成,期间注意观察绿色荧光蛋白的表达情况,选取荧光较强的抗性克隆,采用有限稀释法移至 96 孔板中单克隆化继续培养与扩增。挑选荧光强度最高的克隆扩增,更换 RPMI1640 完全培养液培养细胞并收集不同代数的重组逆转录病毒上清,NIH3T3 细胞测定病毒滴度。

1.2.3 重组载体转染真核细胞以及 EGFP 基因在真核细胞内表达情况的观察 选用人多型性胶质瘤细胞 SW038-C2 作为检测绿色荧光蛋白表达的靶细胞。待 SW038-C2 细胞 60% ~ 70% 融合时,弃去培养上清,加入 PA317-GFP 的培养上清 1 mL,吸附 2.5 ~ 5 h 后加入 RPMI1640 完全培养基 2 mL 继续培养,24 ~ 48 h 后更换含 G418 的 RPMI1640 完全培养液,进行筛选,方法同上。筛选

出来的抗性克隆应用 FACS 检测 EGFP 基因在真核细胞内的表达情况。

1.2.4 噻唑蓝(MTT)比色法测定 SW038-C2 细胞转染前后的生长曲线 消化成单细胞的 SW038-C2、SW038-C2-GFP₀ 和 SW038-C2-GFP₁ 细胞接种于 6 个 96 孔板中,2 000 ~ 4 000 个细胞/孔,每种细胞接种 5 个孔,加入完全培养基置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 温箱内培养,分别测定接种后 6 h、1 ~ 5 d 的 OD 值。测定时,弃去培养上清,每孔加入 100 μL 新鲜培养液,再加入 2 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL,置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 温箱内培养 4 h。吸出上清,加入 DMSO 100 μL,振荡 10 min,使结晶充分溶解。选择 570 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值,取 5 孔的均值。以培养 6 h 细胞刚贴壁时的 OD 值为本底,1 ~ 5 d 测得的 OD 值减去各自的本底所得数值为纵坐标,以时间为横坐标,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 EGFP 基因在 PA317 及 SW038-C2 细胞中整合情况的鉴定 收集 PA317、PA317-GFP、SW038-C2、SW038-C2-GFP₀ 和 SW038-C2-GFP₁ 各约 10⁷ 的细胞,提取基因组 DNA,以其为模板进行 PCR 反应检测基因组 DNA 中 EGFP 基因的整合情况。

2 结 果

2.1 携带有 EGFP 基因的重组逆转录病毒载体的鉴定

用所设计的上下游引物从质粒 pEGFP-C₁ 中扩增出一条目的基因片段,大小约为 840 bp,与理论预测值相符合。逆转录病毒载体(pLXSN)大小为 5.9 kb,选择多克隆酶切位点中的 *Bam*H I 和 *Hpa* I 位点进行双酶切后,载体大小无明显改变(图 1)。从理论上讲,通过定向克隆,把增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因定向插入逆转录病毒载体 pLXSN 的 MCS 中,重组子的大小应为两者碱基大小之和,约 6.7 kb。用 *Bam*H I 对重组子进行单酶切,可得到一条 6.7 kb 大小的 DNA 片段,用 *Bam*H I 和 *Hpa* I 双酶切,则可以得到两条 DNA 片段,一条约 0.8 kb,另一条约 5.9 kb。重组载体转化宿主菌后选取阳性克隆扩增提取质粒 DNA,酶切及 PCR 鉴定,结果均符合理论预测值(图 1)。大连宝生物公司对重组载体中的 EGFP 基因测序结果如下:

```
611 ceatggtgag caagggcgag c(g)agetgttca cgggggtgt gcccatctg
661 gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagtcagcg tgcggcgga gggcgagggo
721 gatgccacct acggcaagct gacctgaag tcatctgca ccaccgcaa gctgccgtg
781 ccttgccca cctctgtac cacctgacc tacggctgc agtcttcag cgtctaccc
841 gaccacatga agcagcagca cttctcaag tcccatcgc ccgaaggta cgtccaggag
901 cgcac(c)catct tctcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccgaggt gaagttcgag
961 ggcgacaccc tgggtaaccg catcgagctg aaggcatcg actcaagga ggacggcaac
1021 atctgggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgttatat catggccgac
1081 aagcagaaga acggcatcaa ggtgaactc aagatcggc acaacatga ggacggcagc
1141 gtcgagctcg ccgaccacta ccagcagaac accccatcg gcgacggccc cgtctgtctg
1201 cccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca aaa(g)accceaa cgagaagcgc
1261 gatcacatgt tctctgtgga gttctgacc gcccgcgga tcaactcgg catggacgag
1321 ctgtacaagt cggactcag atctcgagct caaagctga atctctcagt cgacggtacc
1381 gcggcgccgg gatccaccgg atctagataa ctgacataa
```

测序结果与 Clontech 公司提供基因序列基本相符合,因为在扩增基因过程中未选用高保真酶,目的基因有 3 个碱基发生错配,但未影响发色基团的结构及所保留的 pEGFP-C₁ 多克隆酶切位点(第 1330 位至 1417 位碱基)的结构,在体外细胞实验中也证明所表达的绿色荧光蛋白具有很好的活性。

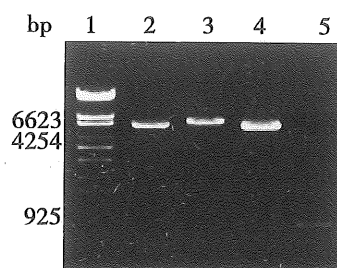


图 1 携带 EGFP 基因的重组逆转录病毒载体的限制性内切酶电泳分析

Fig.1 Electrophoresis analysis of the recombinant retroviral vector which carries enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene digested by restriction enzyme

1: λ-EcoT14 I digestive MARK; 2: pLXSN digested by *Bam*H I; 3: pLXSN-EGFP digested by *Bam*H I; 4: pLXSN-EGFP digested by *Bam*H I and *Hpa* I; 5: PCR product of pEGFP

2.2 PA317-EGFP 细胞系的建立、病毒液的滴度测定

脂质体介导的质粒 DNA 转染 PA317 细胞, G418 筛选培养 3 d 后未转染外源基因的细胞开始死亡, 转染有外源基因的细胞因有新霉素抗性而存活(图 2 箭头所示)。荧光显微镜观察, 转染后第 3 天可见个别细胞开始有绿色荧光蛋白表达, 以后逐渐增多, 但荧光强度不一致。选取荧光强度较强

的克隆(图 3)进行扩增。重组载体病毒上清滴度经测定后第 1 代病毒上清滴度为 3.7×10^4 CFU/mL; 第 2 代为 4.8×10^4 CFU/mL, 第 3 代为 3.1×10^4 CFU/mL, 第 4 代为 2.9×10^4 CFU/mL。

2.3 重组载体在真核细胞内的表达

应用病毒滴度为 4.8×10^4 CFU/mL 的第 2 代病毒上清转染 SW038-C2 细胞(图 4), 筛选出来的抗性克隆有两种形态(图 5 箭头所示), 一种克隆和野生型的 SW038-C2 细胞形态基本相同, 荧光显微镜下观察几乎看不到荧光, 使用 FACS 检测到约有 30.7% 的细胞有 GFP 表达, 该种抗性细胞

命名为 SW038-C2-GFP₀(图 6、9)。另外一种克隆细胞形态变为细长的梭形, 荧光显微镜下可观察到

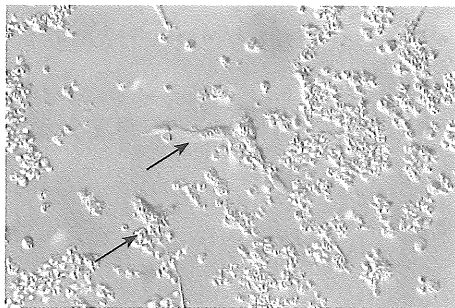


图 2 经 G418 筛选大量死亡的 PA317 细胞及存活的抗性细胞 PA317-GFP

Fig.2 Apoptotic PA317 cells and survival resistant cells PA317-GFP after G418 selection, $\times 200$

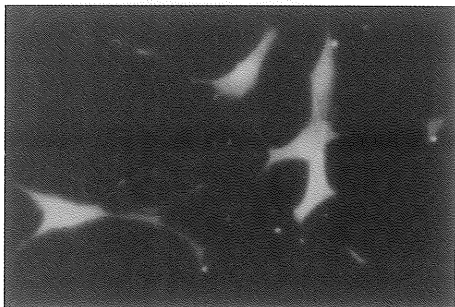


图 3 荧光显微镜下的 PA317-GFP 细胞
Fig.3 PA317-GFP cells observed by fluorescence microscope, $\times 320$

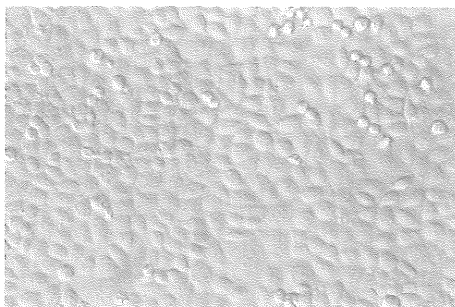


图 4 SW038-C2 细胞
Fig.4 SW038-C2 cells, $\times 200$

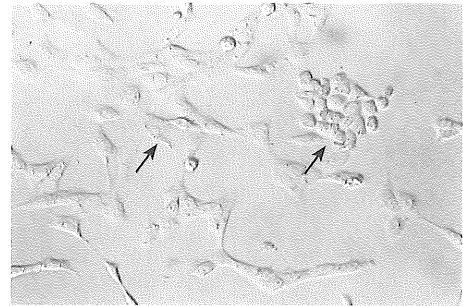


图 5 G418 筛选后出现两种形态的抗性克隆
Fig.5 Two forms of positive clones after G418 selection, $\times 200$

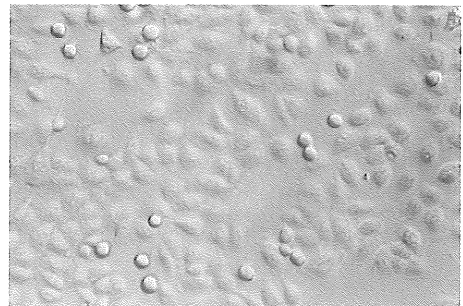


图 6 SW038-C2-GFP₀ 细胞
Fig.6 SW038-C2-GFP₀ cells, $\times 200$

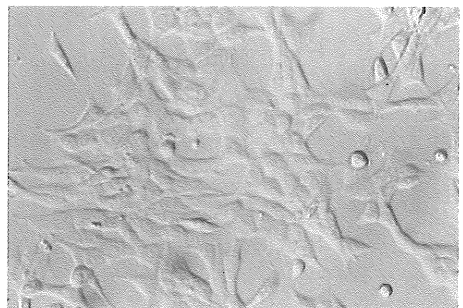


图 7 SW038-C2-GFP₁ 细胞
Fig.7 SW038-C2-GFP₁ cells, $\times 200$

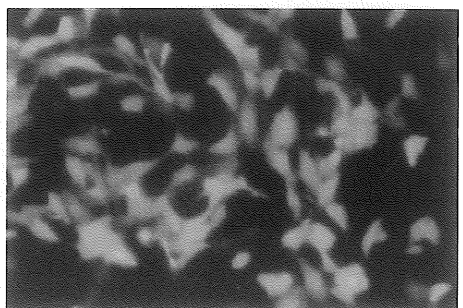


图 8 荧光显微镜下的 SW038-C2-GFP₁ 细胞
Fig.8 SW038-C2-GFP₁ cells observed by fluorescence microscope, $\times 200$

很强的荧光, FACS 检测约有 98% 的细胞有 GFP 表达, 在体外培养 6 个月, 荧光强度没有明显的

衰减, 将该种抗性细胞命名为 SW038-C2-GFP₁ (图 7-9)。

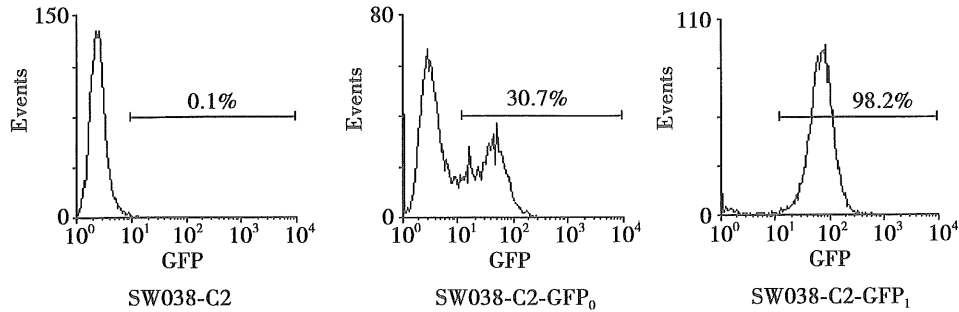


图 9 SW038-C2, SW038-C2-GFP₀, SW038-C2-GFP₁ 细胞 FACS 检测 GFP 表达结果

Fig.9 GFP expression in SW038-C2, SW038-C2-GFP₀, and SW038-C2-GFP₁ cells were observed in FACS

2.4 EGFP 基因在 PA317 及 SW038-C2 细胞中整合情况的鉴定

以 PA317-GFP、SW038-C2-GFP₀ 和 SW038-C2-GFP₁ 细胞基因组 DNA 为模板的 PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示: 用所设计的上下游引物 P'₁ 和 P'₂ 分别从基因组 DNA 中扩增出一条大小约为 0.4 kb 的片段, 符合理论预测值。以 PA317、SW038-C2 细胞基因组 DNA 为模板的 PCR 反应产物未见相应 DNA 条带出现(图 10)。

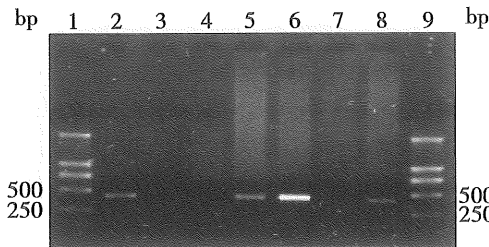


图 10 表达 EGFP 的抗性细胞基因组 DNA 的 PCR 反应结果

Fig.10 PCR reaction results of the genomic DNA of resistant cells expressing EGFP gene

1 and 9: DL2000 MARK; 2: PCR product of pLXSN-EGFP; 3: PCR product of pLXSN; 4: PCR product of genome DNA of SW038-C2; 5: PCR product of genome DNA of SW038-C2-GFP₀; 6: PCR product of genome DNA of SW038-C2-GFP₁; 7: PCR product of genome DNA of PA317; 8: PCR product of genome DNA of PA317-GFP

2.5 噻唑蓝 (MTT) 比色法测定 SW038-C2 细胞转染前后的生长曲线

MTT 法检测显示, SW038-C2、SW038-C2-GFP₀

和 SW038-C2-GFP₁ 细胞的生长情况无明显差异(图 11)。

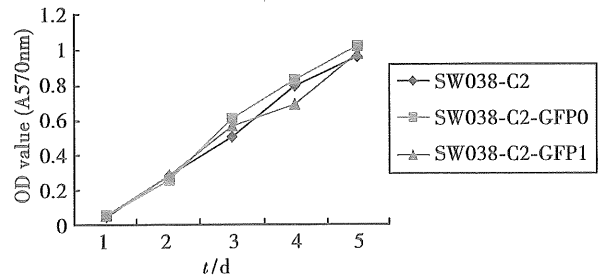


图 11 SW038-C2、SW038-C2-GFP₀、SW038-C2-GFP₁ 细胞生长曲线

Fig.11 Growth curves of SW038-C2, SW038-C2-GFP₀, and SW038-C2-GFP₁ cells

3 讨论

绿色荧光蛋白来源于维多利亚水母, 它无需添加任何底物、酶、辅助因子等物质, 只要暴露于 395 nm 的远紫外光或 488 nm 的蓝光下便可受激而发出绿色荧光, 可以通过荧光显微镜和流式细胞仪在活组织内监测其表达情况^[6]。

构建携带有 EGFP 基因的逆转录病毒载体 pLXSN-EGFP, 使对该载体的转染效率、转染后目的基因表达状况的检测变得非常容易, 而且我们在引物的设计过程中保证获取全部 EGFP 基因序列的同时注意保留了 pEGFP-C₁ 载体的多克隆酶切位点, 为重组载体再插入其他外源基因进一步研究提供了方便。

重组 pLXSN-EGFP 载体经包装细胞 PA317 包装后,能有效转染人脑胶质瘤细胞 SW038-C2 并表达,但是由于 GFP 的表达不是很稳定,有可能发生重排或者表达量低不能被检测到,检测到的基因表达率比实际偏低^[7],我们的实验也证实,即使稳定整合有 EGFP 基因的细胞,在低表达的克隆中,也只有约 30% 的细胞可被检测到,说明使用 GFP 作为报告基因,所能检测到的病毒载体转染效率比实际转染率偏低。

使用包装细胞生产的复制缺陷型逆转录病毒颗粒转染 SW038-C2 人多型性脑胶质瘤细胞,经 G418 筛选后发现,抗性克隆中存在两种形态的细胞 SW038-C2-GFP₀ 和 SW038-C2-GFP₁, 荧光强度微弱者形态与野生型 SW038-C2 细胞基本相同,而荧光强度强的细胞形态为细长的梭形,在体外传代培养 6 个月,荧光强度没有明显的衰减,细胞形态也维持细长形状没有改变,证明过高表达 GFP 对细胞的形态还是有一定的影响,Liu 等^[8]也发现表达不同水平 GFP 或其突变体 EGFP、RSGFP 的 NIH3T3、BHK-21、HepG₂ 细胞中部分形态发生改变甚至出现凋亡;但更多的研究表明 GFP 的表达对宿主细胞的完整性和存活并无明显影响^[9]。我们经 MTT 法测定细胞生长曲线,发现不同表达水平的 GFP 对细胞的生长无抑制现象,与以前的报道相符^[10-11]。

作为一种新的报告基因,GFP 虽然并不完美,但是它可以在基本不影响活细胞正常功能的前提下,使细胞内蛋白质的表达可视化,我们所构建的保留了 pEGFP-C₁ 载体的多克隆酶切位点的逆转录病毒载体 pLXSN-EGFP,可作为后续再插入治疗用基因深入研究的基础,对进一步评价该转移载体在活体中的分布和转染效率、定量分析目的基因体内表达以及探讨有关治疗手段对肿瘤细胞侵袭和转移的影响等等均有着重要的意义!

参考文献:

- [1] Santhosh CV, Tamhane MC, Kamat RH, et al. A lentiviral vector with novel multiple cloning sites; stable transgene expression in vitro and in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008,371(3):546-550.
- [2] Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, et al. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells [J]. *Eur Urol*, 2006,49(1):161-168.
- [3] 王磊,胡英,宋新明,等. 应用 GFP 质粒构建及转染技术探讨 Syk(L)核移位机制 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006,27(06):614-618,639.
- [4] Rautsi O, Lehmusvaara S, Ketola A, et al. Characterization of HIV-1 TAT peptide as an enhancer of HSV-TK/GCV cancer gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008,15(5):303-314.
- [5] Fu W, Lan H, Li S, et al. Synergistic antitumor efficacy of suicide/ePNP gene and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside via *Salmonella* against murine tumors [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008,5(7):474-484.
- [6] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker gene expression [J]. *Science*, 1994,263(5148):802-805.
- [7] Hanazono Y, Yu JM, Dunbar CE, et al. Green fluorescent protein retroviral vectors; low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage [J]. *Hum Gene Ther*, 1997,8(11):1313-1319.
- [8] Liu HS, Jan MS, Chou CK, et al. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999,260(3):712-717.
- [9] Krajaejun T, Gauthier GM, Rappleye CA, et al. Development and application of a green fluorescent protein sentinel system for identification of RNA interference in *Blastomyces dermatitidis* illuminates the role of septin in morphogenesis and sporulation [J]. *Eukaryot Cell*, 2007,6(8):1299-1309.
- [10] Holt JR, Johns DC, Wang S, et al. Functional expression of exogenous proteins in mammalian sensory hair cells infected with adenoviral vectors [J]. *J Neurophysiol*, 1999,81(4):1881-1888.
- [11] Zhao SQ, Feng WL, Zeng JM, et al. Effect of targeted activation of protein kinase PKR on proliferation of leukemia cell line K562 and its mechanism [J]. *Ai Zheng*, 2007,26(10):1058-1063.

(编辑 张恩健)