

前列腺癌患者噬菌体抗体库的构建

赵风进, 黄 健, 林天歆, 黄 海, 许可慰, 潘秋辉

(中山大学附属第二医院泌尿外科, 广东 广州 510120)

摘 要: 【目的】构建前列腺癌患者的噬菌体抗体库, 为前列腺癌特异性的人源性抗体 Fab 片段的筛选及其应用奠定基础。【方法】由前列腺癌患者外周血分离得淋巴细胞, 完整提取其总 RNA, 经 RT-PCR 及半套式扩增得到免疫球蛋白全部轻链和重链 Fd 段基因, 然后经酶切、纯化、连接等步骤克隆进载体 pComb3, 并电转化大肠杆菌 XL1-Blue, 从而构建前列腺癌患者噬菌体抗体库。【结果】成功构建噬菌体抗体 Fab 片段库, 其轻链及重链 Fd 段与载体 DNA 的重组率分别为 87%、79%, 库容为 23.2×10^7 , 滴度为 $87 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$ 。【结论】本研究成功构建了前列腺癌患者噬菌体抗体库。

关键词: 前列腺癌; 噬菌体; 抗体

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)04-0299-05

Construction of Phage-displayed Antibody Library from Patients with Prostatic Carcinoma

ZHAO Feng-jin, HUANG Jian, LIN Tian-xin, HUANG Hai, XU Ke-wei, PAN Qiu-hui

(Department of Urology, The Second Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To construct the Fab phage antibody library of prostatic cancer patients for selection of human specific antibodies against prostate cancer and their future application. 【Methods】Lymphocytes were isolated from peripheral blood of prostatic cancer patients. tRNA was isolated and the light chains and heavy chain Fd fragments of immunoglobulin gene were amplified by PCR and semi-nest PCR, which products were cloned into vector pComb3 and then translocated into *E. Coli* XL1-Blue. The immune Fab phage antibody library of prostatic neoplasm was constructed. 【Results】The recombination rates of light chains and Fd fragments were 87% and 79%, respectively. The volume of the phage library was 23.2×10^6 and the titre was $87 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$. 【Conclusion】The phage antibody library of prostatic cancer patients is constructed successfully.

Key words: prostatic neoplasms; bacteriophages; antibodies

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(4): 299 - 303]

前列腺癌是欧美国家男性中最常见的恶性肿瘤, 在我国近年来其发病率明显上升。因其早期症状不明显, 发现时多已属晚期, 预后较差。以抗肿瘤单克隆抗体为载体进行肿瘤显像与导向治疗在前列腺癌的早期诊断和治疗有广泛的应用前景。但是

目前在此研究领域, 主要应用的是异源性抗体, 用于人体会产生抗体反应, 限制了该方法的应用范围和治疗效果。噬菌体抗体库技术在制备人源性抗体方面拥有独特的优势, 本研究拟利用噬菌体抗体库技术构建前列腺癌患者噬菌体抗体库, 为后期的

收稿日期: 2003-01-04

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001356)

作者简介: 赵风进 (1975 -), 男, 山东莱芜人, 硕士, 现在广州医学院荔湾医院工作; 黄 健, 教授, 硕士生导师, 课题负责人, 通讯作者。

E-mail: yhjn@yahoo.com.cn

筛选出针对前列腺特异性膜抗原的 Fab 抗体, 获得人源化抗体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 XL1-blue、噬菌粒 pComb3 和辅助噬菌体 VCSM13 由中山大学基础医学院寄生虫教研室詹希美教授惠赠。Trizol 试剂、逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; Taq 酶、限制性核酸内切酶购自美国 Promega 公司; 凝胶 DNA 回收 kit 和质粒提取 kit 为德国基因公司 Qiagen 试剂盒; T4 DNA 连接酶购自宝生生物工程(大连)有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 本院泌尿外科门诊及住院的 20 名前列腺癌患者为采血对象, 每人抽外周静脉血 15 mL。使用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞后, 用 Trizol 试剂盒提取淋巴细胞总 RNA, 保存于 -70°C 。RNA 变性电泳鉴定 RNA 的完整性。

1.2.2 免疫球蛋白轻链和重链基因的扩增 以

表 1 人免疫球蛋白 PCR 引物

Human Fd chain 3' primers	
5'-CTC AC ACT AGT TTT GCG CTC AAC TGT CTT-3'	CG2A
5'-TGT GTG ACT GTC ACC AAG TGG GGT TTT-3'	CG3A
5'-GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG-3'	CG1Z
5'-GCT CAC ACT AGT AGG CAG CTC AGC AAT CAC-3'	CM1
Human Fd variable chain 5' primers	
5'-(C/G)AG GTG CAG CTC GAG (C/G)AG TCT GGG-3'	VH1. 3A
5'-(C/G)AG GTG CAG CT (A/G) CTC GAG TCT GG-3'	VH1. 2. 3F
5'-CAG GTG CAG CT(A/G) CTC GAG T(C/G)G GG-3'	VH4F. G
5'-CAG GTA CAG CTC GAG CAG TCA GG-3'	VH6A
Human κ 3' primer	
5'-GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT TTG TGA CGG GCG AAC TCA G-3'	C κ 1D
Human κ variable chain 5' primers	
5'-GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CC-3'	V κ 1S
5'-GAA ATT GAG CTC ACA CAG TCT CCA-3'	V κ 3B
5'-GA(C/T) AT(C/T) GAG CTC AC(T/C) CTG TCT CCA-3'	V κ 1. 3A
Human λ 3' primer	
5'-GCG CGT CTAGAA TTA TGA ACA TTC TGT AGG-3'	CL2
Human λ variable chain 5' primers	
5'-AAT TTT GAG CTC ACT CAG CCC CAC-3'	VL1
5'-TCT G(C/T)(C/G) GAG CTC CAG CC(T/G) (C/G) CC TC(A/C) GTG-3'	VL 2. 3
5'-TCT GAA GAG CTC CAG GAC CCT GTT GTG TCT GTG-3'	VL4
5'-CAG (G/T)(C/T)T GAG CTC AC(G/T) CA(A/G) CCG CCC-3'	VL5. 7
5'-CAG ACT GAG CTC ACT CAG GAG CCC-3'	VL6

总 RNA 为模板, 以寡核苷酸 Oligo(dT)₂₀ 为引物, 逆转录合成 cDNA, 然后以其为模板, 我们利用 Kang 等^[1, 2]分组设计的轻、重链引物(表 1-2)互相配对, 分别在不同退火温度下扩增得到全部轻链(κ 、 λ)及大部分重链 Fd 段基因。对于改变 PCR 反应条件未能扩增出的重链片段, 采用半套式扩增的方法得到^[2]。引物的序列如下。

表 2 人免疫球蛋白信号肽 PCR 引物

Table 2 PCR primers for human immunoglobulin signal peptides

5'-ATG GAC TGG ACC TGG AGG (A/G)TC (T/C)TC T(G/T)C-3'
5'-ATG GAC (C/T)TT GGG CTG A(C/G)C TGG(C/G)TT T(C/T)T-3'
5'-ATG (A/G)A (A/C) (A/C) (A/T)A CT (G/T)TG (G/T) (A/T) (C/G)C (A/T)(C/T)(C/G)G CT (C/T)XTG-3'

1.2.3 噬菌体抗体库的构建 ①将扩增、纯化的轻链 $\kappa + \lambda$ 链基因 ($\kappa : \lambda = 2 : 1$) 和噬菌粒 pComb3 DNA 用限制性内切酶 *Sac* I + *Xba* I 分别进行双酶切、纯化回收后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接反应, 连接产物 pComb3-L 经电穿孔进入大肠杆菌 XL1-Blue, 构建成轻链库, 电转化条件为: 2.5 kV, 200 Ω , 25 μFD ; ②将电转化后铺板形成的重组克隆计数, 算出转化率; 随机挑取铺板形成的重组克隆, 提取重组质粒 DNA, 分别用 *Xho* I + *Xba* I 进行双酶切反应, 鉴定轻链的重组率; ③将扩增、纯化的 Fd 段基因和 pComb3-L 用限制性内切酶 *Xho* I + *Spe* I 分别进行双酶切、纯化回收后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接反应, 连接产物 pComb3-L-Fd 经电穿孔进入大肠杆菌 XL1-Blue, 电转化条件为 2.5 kV, 200 Ω , 25 μFD , 同时用辅助噬菌体 VCSM13 超感染, 大量扩增后, 离心取上清即得人源性 Fab 抗体库; ④用同样方法计算转化率及重组率; ⑤噬菌体抗体库滴度 (ϕfu) 的测定: 挑取一 XL1-blue 菌落, 接种于 4 mL LB (含 tet), 摇菌培养至 $A_{600} \leq 1.0$ 。将噬菌体抗体库稀释至 10^{-5} 、 10^{-7} 、 10^{-9} 、 10^{-10} , 各吸以上 4 个稀释度的噬菌体 10 μL 和 100 μL XL1-blue 混合, 分别铺于 4 块 LB/amp 平板, 置 37°C 培养 24 h 后, 选取合适的平板, 数出克隆数, 计算出每毫升噬菌体所形成的克隆数 (ϕfu)。

2 结果

2.1 κ 、 λ 链基因的扩增

从淋巴细胞提取的总 RNA 反转录出第一链 cDNA 后,用 κ/λ 链 5'端与 3'端引物弧线配对 (共 8 对),改变 PCR 反应条件扩增出全部轻链,经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果显示在约 700 bp 处均可见明显的扩增条带 (图 1)。

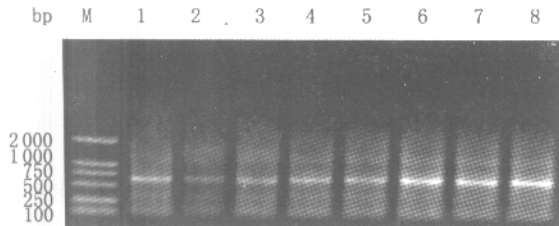


图 1 轻链的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of light chain

M : DNA Maker DL 2 000 ; 1 : CL2-VL1; 2 : CL2-VL2. 3; 3 : CL2-VL4; 4 : CL2-VL5. 7; 5 : CL2-VL6; 6 : C κ 1D-V κ 1S; 7 : C κ 1D-V κ 3B; 8 : C κ 1D-V κ 1. 3A

2.2 重链 Fd 段基因的扩增

同样以 cDNA 为模板,用重链 Fd 段 5'端引物分别与 3'端引物 (共 16 对),改变 PCR 反应条件扩增出 13 对,半套式 PCR 扩增出另外 3 对。经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果显示在约 700 bp 处均可见明显的扩增条带 (图 2、3)。

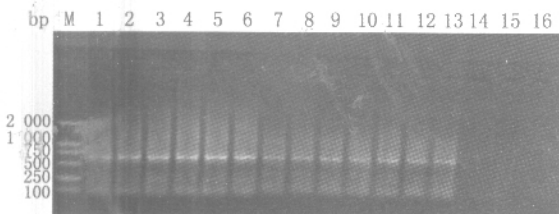


图 2 重链 Fd 段的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of Fd fragment in heavy chain

M: DNA Maker DL 2 000 ; 1 : CG2A-VH1. 3A; 2 : CG2A-VH1. 2. 3F; 3 : CG2A-VH4F. G; 4 : CG2A-VH6A; 5 : CG3A-VH1. 3A; 6 : CG3A-VH1. 2. 3F; 7 : CG3A-VH4F. G; 8 : CG1Z-VH1. 3A; 9 : CG1Z-VH1. 2. 3F; 10 : CG1Z-VH4F. G; 11 : CM1- VH1. 3A ; 12 : CM1-VH4F. G; 13 : CM1-VH6A; 14 : CG3A-VH6A; 15 : CG1Z-VH6A; 16 : CM1-VH1. 2. 3F

2.3 轻链库的鉴定

将经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切的 $\kappa + \lambda$ 链片段 ($\kappa : \lambda = 2 : 1$) 和 pComb3 DNA 的连接产物电转化后铺板形成的重组克隆计数,算出转化率 (即每微克 DNA 转化后产后的克隆数)为 58×10^6 。随机挑取 15 个电转化后铺板形成的重组克隆,提取重组质粒 DNA,分别用 *Xho* I 和 *Xba* I 进行双酶切反

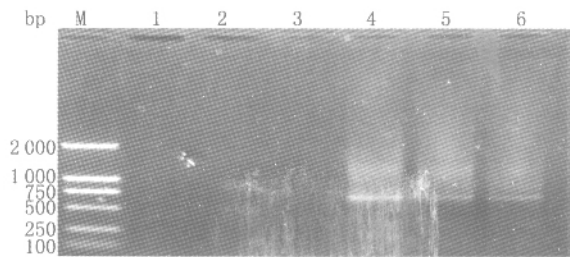


图 3 半套式 PCR 扩增重链 Fd 段的结果

Fig. 3 Semi-nested PCR amplification of Fd fragment in heavy chain

M: DNA Maker DL 2 000 ; 1: Regular PCR result with primers CG3A-VH6A; 2: Regular PCR result with primers CG1Z-VH6A; 3: Regular PCR result with primers CM1-VH1. 2. 3F; 4: Semi-nested amplification with primers CG3A-VH6A ; 5: Semi-nested amplification with primers CG1Z-VH6A; 6 : Semi-nested amplification with primers CM1-VH1. 2. 3F

应,然后在 8 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,结果显示在 15 个重组克隆中,有 13 个泳道释放出 3 kb + 1.7 kb 的 2 个条带,为阳性克隆 (含 κ 或 λ 链基因);有 2 个泳道释放出 3 kb + 1 kb 的 2 个条带,为空质粒,由此得出轻链库的重组率为 $13/15 = 87\%$ (图 4)。

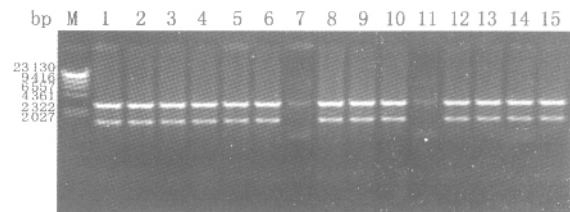


图 4 轻链库的酶切鉴定

Fig. 4 Enzyme digestion identification of light chain gene library

Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15: 3 kb + 1.7 kb; Lane 7, 11: 3 kb + 1.0 kb; Lane M: λ -Hind III digested marker

2.4 Fab 噬菌体抗体库的鉴定

将 Fd 片段 PCR 产物和轻链重组质粒 DNA 分别经 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切、纯化、连接,连接产物电转化后铺板形成的重组克隆计数,算出转化率为 $49 \times 10^6 \mu\text{g}^{-1}$;随机挑取 14 个电转化后铺板形成的重组克隆,提取重组质粒 DNA,分别提取重链重组质粒 DNA,分别用 *Xba* I 和 *Xho* I 进行双酶切反应。在 8 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,结果显示在 14 个重组克隆中,有 11 个泳道出现 3 kb + 2.4 kb 的条带,为阳性克隆 (含轻链和重链 Fd 片段),2 个泳道出现 3 kb + 1.7 kb 的条带 (只含轻链或重链

Fd 片段中的任意一个片段),1 泳道出现 3 kb + 1.0 kb 的条带,为空质粒(图 5),由此得出抗体库的重组率为 $11/14 = 79\%$ 。将含噬菌体抗体的上清经 PEG8000 沉淀浓缩后,涂板法测得噬菌体抗体库滴度为 $87 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$ 。库容量为转化率 \times 转化 DNA 量 \times 抗体库重组率 = $49 \times 10^6 \mu\text{g}^{-1} \times 0.6 \mu\text{g} \times 79\% = 23.2 \times 10^6$ 。

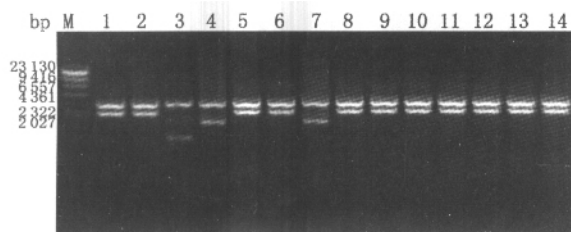


图 5 噬菌体 Fab 抗体库的酶切鉴定

Fig. 5 Enzyme digestion identification of Fab phage antibody library

Lane 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14: 3 kb + 2.4 kb; Lane 4, 7: 3 kb + 1.7 kb; Lane 3: 3 kb + 1.0 kb; Lane M: λ -Hind III digest marker

3 讨论

抗体技术的发展经历了 3 个阶段,第一代抗体为血清多克隆抗体,1975 年 Kohler 和 Milstein 创立了单克隆杂交瘤技术,产生了第二代抗体即单克隆抗体。虽然第二代单克隆抗体具有纯度高、特异性好、能无限传代等优点,但由于无法得到稳定的人源性杂交瘤细胞株,以及操作繁琐、成本高等问题,使之一直无法直接运用到人身上。因此,围绕着如何现有的鼠源单抗进行人源化改造及对生产人源性单抗等问题,基因工程抗体应运而生。噬菌体抗体库技术是一种制备人源性单克隆抗体的新技术。由于其不经过免疫也可直接从天然噬菌体抗体库中筛选出特异性抗体,且筛选效率高,因此,为单克隆抗体的研制带来质的飞跃。由于人源性抗肿瘤单抗对于临床上肿瘤抗体导向治疗和显像具有重要的意义,故近年来利用噬菌体抗体库技术研制人源性抗肿瘤单抗受到关注。已有利用此技术研制抗肿瘤、病毒及自身免疫性疾病等人源性单抗的报道^[3-5]。尽管不经过免疫也可从天然噬菌体抗体库中筛选出特异性抗体,然而,大部分学者认为经过特异性抗原免疫后再构建的噬菌体抗体库中更易筛选出特异性好、亲和力更高的抗体。因此,我们选择前列腺癌患者为采血对象,可以识别前列腺癌

组织的 B 细胞得到了大量增殖,更有利于建库后抗体的筛选。

有足够大库容量与多样性的抗体库,才可能从中筛选出针对多种抗原的抗体。库容量的主要影响因素有:①大肠杆菌的转化效率:采用电穿孔法^[6],其转化效率最高可达到每微克 DNA 为 1 010 个转化子,即使在培养液中使用抗生素,使电穿孔法的转化效率显著地降低,也是化学转化法无可比拟的。目前所报道的抗体库的库容量最高为 10^8 ,平均介于 $10^6 \sim 10^7$ 之间。我们也采用电穿孔的方法,得到 23.2×10^6 的抗体库;② PCR 引物的设计:由于免疫球蛋白基因种类多,且分为较多亚型,如何设计 PCR 引物对构建高丰度抗体库十分重要,我们利用 Kang 等^[11]分组设计的轻、重链引物,分别在不同退火温度下扩增得到全部轻链(κ 、 λ)及大部分重链特异性 PCR 产物,且产量较多。对于通过改变退火温度等 PCR 条件仍无法扩增出的 3 条重链,我们采用半套式两次 PCR 进行扩增,得到其特异性条带。所以,我们通过改变 PCR 反应条件和半套式扩增联合应用获得尽可能多的免疫球蛋白可变区基因,对于构建尽可能大库容的噬菌体抗体库,从而筛选到前列腺癌组织成分的抗体是至关重要的;③噬菌粒的包装滴度(效率):抗体库的多样性主要由细菌转化效率所决定,库的大小受噬菌体滴度的限制。噬菌体库中所包装噬菌粒的噬菌体滴度越高,发现稀有抗体的机率就越大。Soderlind 等^[7]研究了伴侣蛋白(chaperonin)对噬菌体 M13 组装的影响,将伴侣蛋白 CroE 基因插入到噬菌粒载体中,使之与 PEXmids 共同表达,同样条件下使 PEXmids 包装滴度由 $0.4 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$ 增至 $0.7 \times 10^{12} \text{ mL}^{-1}$;④载体酶切位点的选择:尽量选用在可变区基因内没有或很少见到酶切位点,从而保证抗体库中所有的可变区基因都不被切掉。本研究选用的载体酶切位点是根据 Chaudhary 等^[8]应用计算方法对近 40 种限制性酶切位点分析,选出酶切频率为零或极低的几种内切酶,不过要真正做到载体所选用的酶在抗体 V 基因序列中没有切割位点,还取决于对更多抗体 V 基因序列的了解。

构建了前列腺癌患者噬菌体抗体库后,我们将从中筛选针对前列腺特异膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)膜外位点的抗体 Fab 片段,检测其特异性及活性。由于 PSMA^[9]是前列腺细胞特异的细胞膜成分蛋白,有良好的器官特异性,

在前列腺癌,尤其是在激素非依赖性前列腺癌细胞、转移癌及复发癌中高表达,所以在前列腺癌的特异性放射免疫显像诊断及导向治疗方面具有重要的临床意义。并且我们制备的是与PSMA胞外区特异结合的抗体,会进一步提高该抗体的显像与治疗效果,为前列腺癌特别是激素不敏感性前列腺癌及多发、微小、不能切除的转移灶的治疗开拓广阔的前景。

参考文献:

- [1] Kang A S, Jone T M, Burten D R. Antibody redesign by chain shuffling from random combinational immunoglobulin libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(24): 11120-3.
- [2] 田学军,寿成超,孟麟,等. PCR条件及程序改变对抗体库多样性的影响[J]. 生物化学与生物进展, 1999, 26(6): 172-6.
- [3] Wu B P, Xiao B, Wan T M, et al. Construction and selection of the natural immune Fab antibody phage display library from patients with colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2001; 7(6): 811-5.
- [4] Zhang Z C, Hu X J, Yang Q. Generation of high affinity

human single-chain antibody against PreS1 of hepatitis B virus from immune phage-display antibody library[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(1): 77-81.

- [5] Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases[J]. Drug Discov Today, 2003, 8(18): 845-51.
- [6] 赵禹,侯秉璋,乔玲,等. 电转化技术在噬菌体抗体库构建中的应用[J]. 天津医科大学学报, 2002, 8(4): 413-5.
- [7] Soderlind E, Lagerkvist A C, Duenas M, et al. Chaperonin assisted phage display of antibody fragments on filamentous bacteriophages[J]. Bio Technology, 1993, 11(4): 503-7.
- [8] Chaudhary V K, Batra J K, Gallo M G, et al. A rapid method of cloning functional variable-region antibody gene in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(3): 1066-70.
- [9] 叶传忠,唐群业,张永康. 前列腺特异膜抗原(PSMA)的检测及临床应用进展[J]. 国外医学临床生物化学与检测学分册, 2001, 22(1): 46-7.

(编辑 张敏瑞)

(上接第298页 from page 298)

成体脑中,NeuN严格分布在神经核、核周体和一些近端神经元突起中。但在检测骨髓细胞nestin的同时做NeuN检测,不论从免疫细胞化学还是FACS角度均证实骨髓细胞早期(6d)即有NeuN表达,且伴随nestin表达而增强,细胞有形成克隆团样倾向。培养15d后与nestin表达存在此长彼消趋势,到表达高峰期(30d)已呈神经元样细胞。以上现象说明:表达NeuN的细胞在成为神经元样细胞之前,形态上是大圆形细胞,但已具备神经元的生物学基础,同时具有增殖分裂特性。也可认为,NeuN阳性细胞和nestin阳性细胞本质上是同一种细胞,只是发育阶段不同。为此,神经细胞移植时可否考虑择选此类细胞移植,理论上应该比表达nestin的神经干细胞移植更直接。

3.3 骨髓细胞分化为神经细胞的前景

骨髓在未来的组织工程技术发展中将处于核心位置^[6],不仅它是两种类型干细胞(HSCs和MSCs)的定居器官,而且它的优点在于:①容易从成体中收集和培养;②与胚胎干细胞相比,既不存在伦理、道德问题,也不存在来源及数量有限等问题。骨髓细胞向神经细胞(神经元及胶质细胞)方向诱导分化的成功,可较好地解决移植中的免疫排斥

问题和供体数量有限等问题,为神经干细胞移植疗法提供丰富的种子细胞源。

参考文献:

- [1] Azizi S A, Stokes D, Augelli B J, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3908-13.
- [2] Eglitis M A, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(8): 4080-5.
- [3] Mokry J, Nemecek S. Angiogenesis of extra- and intra-embryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells[J]. Folia Biol (Praha), 1998, 44(5): 155-61.
- [4] 项鹏,夏文杰,王连荣,等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(5): 321-4.
- [5] Wolf H K, Buslei R, Schmidt-Kastner R, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology[J]. J Histochem Cytochem, 1996, 44(10): 1167-71.
- [6] Bianco P, Robey P G. Stem cells in tissue engineering[J]. Nature, 2001, 414(6859): 118-21.

(编辑 刘清海)