

应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选HCVp7蛋白的反式调节基因

郭江, 成军, 纪冬, 赵龙凤, 王建军, 刘妍, 黄燕萍

郭江, 成军, 纪冬, 王建军, 刘妍, 黄燕萍, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 北京市 100039
赵龙凤, 山西医科大学第一附属医院感染病科 山西省太原市 030001
郭江, 男, 1976-06-13 生, 山西省壶关县人, 汉族, 2002 年山西医科大学传染病学硕士生, 主要从事传染病的临床工作和病毒性肝炎的实验研究。
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队九五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心。cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Screening and cloning of target genes transactivated by hepatitis C virus p7 protein

Jiang Guo, Jun Cheng, Dong Ji, Long-Feng Zhao, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Yan-Ping Huang

Jiang Guo, Jun Cheng, Dong Ji, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Yan-Ping Huang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Long-Feng Zhao, Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038
Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, 100 Contral Xisihuan Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To clone and identify human genes transactivated by hepatitis C virus p7 (HCVp7) protein.

METHODS: Suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatic techniques were used for screening and cloning of the target genes transactivated by HCVp7 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-p7 and pcDNA3.1(-) empty vector respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After digestion with restriction enzyme *Rsa* I, cDNAs of small size were obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and 2 respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent nested PCR twice, and then the product was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the

library was carried out after transfected with *E. coli* strain DH5 α . The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

RESULTS: The subtractive library of genes transactivated by HCVp7 was constructed successfully. The amplified library contained 71 positive clones. Colony PCR showed that 56 clones contained 200-1 000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 33 clones randomly, and the full-length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 15 coding sequences were obtained, including 14 known and 1 unknown.

CONCLUSION: The obtained sequences may be target genes transactivated by HCV p7, and some genes coding proteins get involved in cell cycle regulation, metabolism, and cell apoptosis.

Guo J, Cheng J, Ji D, Zhao LF, Wang JJ, Liu Y, Huang YP. Screening and cloning of target genes transactivated by hepatitis C virus p7 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(11):2590-2593

摘要

目的: 构建丙型肝炎病毒HCV p7蛋白反式激活相关基因差异表达的差异cDNA, 克隆HCV p7蛋白反式激活相关基因。

方法: 以HCV p7表达质粒pcDNA3.1(-)-p7转染HepG2细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-)为对照; 制备转染后的细胞裂解液, 从中提取mRNA并合成cDNA, 经*Rsa* I酶切后将实验组cDNA分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组cDNA进行两次消减杂交及两次抑制性PCR, 将产物与T/A载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建人HCV p7蛋白反式激活相关基因差异表达的cDNA。扩增后得到56个200-1 000 bp插入片段的克隆, 随机挑选其中33个插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得15种编码基因, 其中1个为未知功能的新基因。

结论: 筛选到的cDNA全长序列, 包括与细胞生长调节、物质代谢、和细胞凋亡密切相关的一些蛋白编码基因。

郭江, 成军, 纪冬, 赵龙凤, 王建军, 刘妍, 黄燕萍. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选 HCVp7 蛋白的反式调节基因. *世界华人消化杂志*. 2004;12(11): 2590-2593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2590.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是世界范围内慢性肝炎的主要病原之一^[1-2], 约有 1.7 亿人被感染, 常导致严重肝病, 包括肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[3-5]. HCV的基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF), 编码一个约 3 010 个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白, 该多蛋白被细胞和病毒蛋白酶切割产生至少 10 个病毒基因产物: core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B 蛋白等^[6-8]. p7 是由 HCV 基因组 2580-2768 核苷酸(nt)之间的基因编码的由 63 个氨基酸残基(aa)组成的小蛋白. 关于其功能研究较少. 我们利用抑制性消减杂交技术构建 p7 作用于肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞的反式调节 cDNA 消减文库, 筛选差异表达的基因片段, 并应用生物信息学进行分析, 为加深了解 p7 的功能, 进一步探讨 HCV 发病及致癌机制提供新的研究方向.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; FuGENE6 转染试剂购自 Roche 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司, PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒、50 \times PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech 公司, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司. HCV p7 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-p7 由本室构建. 用 FuGENE6 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-p7 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞. 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2 方法 消减杂交文库的建立采用 Clontech 公司的 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行. 以转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, dscDNA 经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 dscDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver dscDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增. 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h. 共得到 71 个白色菌落, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明 56 含有插入片段后(200-1 000 bp), 随机挑选其中个 33

个克隆增菌, 测序(上海申友公司), 并且应用生物信息学将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析.

2 结果

紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞提取 mRNA 分别为 1.58 μ g 和 2.24 μ g, $A_{260}/A_{280}=2.18.20$ g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量完全满足进行消减杂交的要求.

2.1 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 以消减及未消减 PCR 产物为模板, 用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增, 分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5 μ L 进行电泳鉴定. 结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1).

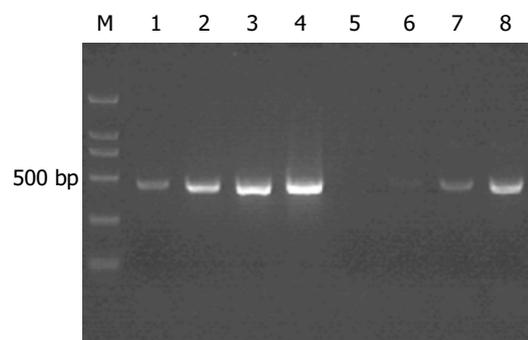


图 1 消减效率分析. 1-4: 未消减组; 5-8: 消减组; 引物分别为 G3PDH3' 5' PCR 循环为 18, 23, 28, 33 次.

2.2 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 菌落 PCR 扩增结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段, 所获得的 71 个克隆中 56 含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2).

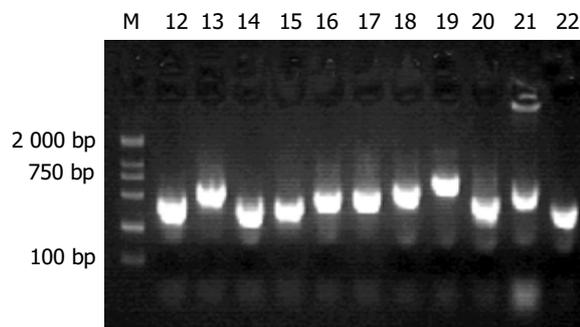


图 2 部分克隆 HCVp7 菌落 PCR 鉴定电泳图.

2.3 cDNA 测序与同源性分析结果 挑选 33 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 32 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(95-100%)1 个克隆未检索到任何相应的相似序列, 代表了新基因, 命名为 HCV p7TP1, GeneBank 注册号为 AY596776(表 1).

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白名称	同源克隆数	同源性(%)
核糖体蛋白	5	98-100
SMT3H2 蛋白	6	95-100
乌洛托品结合蛋白(FBP3)	3	97-98
真核翻译起始因子(eIF2A)	2	97-98
线粒体单倍体	3	98-99
二氢二醇脱氢酶	3	100
MSH5 蛋白	3	99
RNA 多聚酶 II, TATA	1	95
盒结合蛋白相关因子(TAF6)		
内质网硫氧还蛋白(TLP19)	1	96
环指蛋白	1	100
唾液酸糖蛋白受体 I(ASGP-R)	1	100
RAD21 蛋白	1	98
T 细胞白血病病毒 I 型结合蛋白 1(TAX1BP1)	1	100
芳香族受体(HOR)	1	98
新基因序列	1	
克隆总计	33	

3 讨论

HCV p7 是一个小的疏水性多蛋白, 编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间. p7 可在黑脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 推测其功能与病毒离子孔道蛋白(viroporin)类似, 可使细胞内膜结构不稳定化, 以利于成熟的病毒颗粒释放^[9-10], 这一离子通道可被金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物抑制^[11-13]. p7 对病毒复制并不是关键的, 但对感染性病毒的产生是必不可少的^[14]. p7 仍有许多功能没有研究清楚, 对其反式激活作用的研究更少. 为进一步研究 p7 的功能, 明确 p7 在丙型肝炎发病机制中的作用, 利用抑制性消减杂交技术^[15-17](suppression subtractive hybridization, SSH)筛选并克隆 HCV p7 反式激活的靶基因, 推测其在体内可能存在功能的线索. SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[18-21]. 我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-p7, 转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 p7 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 挑选 33 个克隆测序分析, 主要包括两种类型的序列, 即已知功能的基因序列和未知功能的基因序列. 在本次实验中获得 1 个差异表达的未知序列, 对其基因结构和功能正在研究之中.

在已知功能基因序列中, 主要包括: (1)细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如核糖体 L7 蛋白、真核翻译

起始因子 2A(eIF2A)、环指蛋白 7、MSH5, 还有线粒体蛋白等. (2)参与细胞内代谢的蛋白基因, 如 TLP19、二氢二醇脱氢酶可代谢肝脏的多环芳香烃(DDH), DDH1/2 的表达上升与肝癌的大小和疾病进展的相关^[22-24]. (3)参与细胞内信号转导的蛋白基因, 如 SMT3H2、FBP3、Rad21 和 TAX1BP1. p7 上调 TAX1BP 基因的表达可能是 HCV 致癌的机制之一. (4)其他蛋白, 如唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)等.

通过对 HCV p7 的上述反式激活基因的分析, 我们发现他与体内物质代谢、信号转导、凋亡关系密切^[25-26], 在病毒感染后肝细胞恶性变方面有一定的作用, 而且对于 HCV 病毒颗粒结合和进入肝细胞是重要的. 关于 HCV p7 在体内与各种活性因子的具体调节机制, 仍需进行详细的实验来研究. HCV p7 抑制性消减文库的建立为研究其功能提供了理论依据, 并为 HCV 致癌机制提供了新的研究方向.

4 参考文献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 2 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 4 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选 NS5ATP3 转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:306-310
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 6 Wietzke-Braun P, Braun F, Sattler B, Ramadori G, Ringe B. Initial steroid-free immuno suppression after liver transplantation in recipients with hepatitis c virus related cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2213-2217
- 7 Gong GZ, Jiang YF, He Y, Lai LY, Zhu YH, Su XS. HCV NS5A abrogates p53 protein function by interfering with p53-DNA binding. *World J Gastroenterol* 2004;10:2223-2227
- 8 Anand BS, Velez M. Assessment of correlation between serum titers of hepatitis c virus and severity of liver disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:2409-2411
- 9 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003;535:34-38
- 10 Pavlovic D, Neville DC, Argand O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain minosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6104-6108
- 11 Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-5338
- 12 Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for mantadine-sensitive ion hannel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004;85:451-461
- 13 Branza-Nichita N, Durantel D, Carrouee-Durantel S, Dwek RA, Zitzmann N. Antiviral effect of N-butyldeoxyojirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J Virol* 2001;75:3527-3536

- 14 Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:11646-11651
- 15 Dong XY, Pang XW, Yu ST, Su YR, Wang HC, Yin YH, Wang YD, Chen WF. Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method. *Int J Cancer* 2004;112:239-248
- 16 Galbraith EA, Antonopoulos DA, White BA. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environ Microbiol* 2004;6:928-937
- 17 Hou L, Tang JW, Cui XN, Wang B, Song B, Sun L. Construction and selection of subtracted cDNA library of mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis potential. *World J Gastroenterol* 2004;10:2318-2322
- 18 Sun W, Zhang K, Zhang X, Lei W, Xiao T, Ma J, Guo S, Shao S, Zhang H, Liu Y, Yuan J, Hu Z, Ma Y, Feng X, Hu S, Zhou J, Cheng S, Gao Y. Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Cancer Lett* 2004;212:83-93
- 19 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 张树林. 抑制性消减杂交技术原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:456-458
- 20 Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* 2002;3:12
- 21 王方, 王宇明. 抑制性消减杂交技术及其在感染病学中的应用. *世界华人消化杂志* 2004;12:972-975
- 22 Tang DW, Chang KW, Chi CW, Liu TY. Hydroxychavicol modulates benzo[a]pyrene-induced geno toxicity through induction of dihydrodiol dehydrogenase. *Toxicol Lett* 2004; 152:235-243
- 23 Ozeki T, Takahashi Y, Nakayama K, Funayama M, Nagashima K, Kodama T, Kamataki T. Hepatocyte nuclear factor-4 alpha/gamma and hepatocyte nuclear factor-1 alpha as causal factors of interindividual difference in the expression of human dihydrodiol dehydrogenase 4 mRNA in human livers. *Pharmacogenetics* 2003;13:49-53
- 24 Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Shih CS, Lin TY, Chow KC. Expression of dihydrodiol dehydrogenase in the resected stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2002;9:515-519
- 25 Pati D, Zhang N, Plon SE. Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of Rad21. *Mol Cell Biol* 2002;22:8267-8277
- 26 Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. Role of the sialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 2003;77:546-659

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.

World Journal of Gastroenterology 点击和下载次数

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》从 2003 年第 4-9 期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数. 4-9 期共发表论文 322 篇, 其中 265 篇有点击和下载次数的记录, 占 82.29%, 无点击和下载次数记录的为 57 篇(17.70%). 2003-04-15/2003-10-13, 265 篇论文的点击次数为 35745, 平均每篇论文点击次数为 134.89, 最高点击次数为 1 918, 最低点击次数为 11. 其中每篇论文点击次数 100 次以上为 131 篇(49.43%); 30-99 次为 123 篇(46.41%); 11-29 次为 11 篇(4.15%). 最高下载次数 1 087, 最低下载次数 10. 例如, 2003 年第 8 期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为 1 918, 下载次数为 1 087.