

pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒的构建及鉴定

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 智发朝, 钟世顺, 南清振, 武金宝, 崔忠林

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 智发朝, 钟世顺, 南清振, 武金宝, 崔忠林, 广州南方医科大学南方医院消化疾病研究所 广东省广州市 510515
任玥欣, 女, 1974-12-09 生, 山东省济南市人, 汉族. 2004 年广州南方医科大学博士, 讲师, 主要从事胰腺疾病诊断及治疗研究.
国家自然科学基金项目, No. 30370648
项目负责人: 宋于刚, 510515, 广东省广州市, 广州南方医科大学南方医院消化疾病研究所. drrren@tom.com
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-19

Construction and identification of eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-MCP-1 and pcDNA3.1(+)-Gro α

Yue-Xin Ren, Yu-Gang Song, Xue-Qing Chen, Fa-Chao Zhi, Shi-Shun Zhong, Qing-Zhen Nan, Jin-Bao Wu, Zhong-Lin Cui

Yue-Xin Ren, Yu-Gang Song, Xue-Qing Chen, Fa-Chao Zhi, Shi-Shun Zhong, Qing-Zhen Nan, Jin-Bao Wu, Zhong-Lin Cui, Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30370648
Correspondence to: Dr. Yu-Gang Song, Institute of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. yz xu@fimmu.com
Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To construct and identify the eukaryotic expression plasmid for rat MCP-1 and Gro α .

METHODS: According to the published MCP-1 Gro α cDNA sequence in GeneBank, a pair of primers were respectively designed and synthesized. The total RNA was isolated from rats with acute pancreatitis. After amplification with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the product was cloned into pGEM-T easy vector using TA cloning followed by *Bam* H I and *Eco* R I digestion. The target sequences were then subcloned into a highly efficient eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The recombinants were finally sequenced and identified by restrictive endonuclease digestion.

RESULTS: pcDNA3.1(+)-MCP-1 and pcDNA3.1(+)-Gro α eukaryotic expression vectors were successfully constructed, and they were identified by PCR, double restrictive endonuclease digestion and sequence analysis. The target fragment MCP-1 was the same as AF058786 in GenBank and the fragment Gro α was different from NM_030845 (nt92-nt94) in GenBank. Repeated tests confirmed that NM_030845 (nt21-nt23) in GenBank was not correct.

CONCLUSION: The MCP-1 and Gro α eukaryotic expression vectors are successfully constructed and identified.

Ren YX, Song YG, Chen XQ, Zhi FC, Zhong SS, Nan QZ, Wu JB, Cui ZL. Construction and identification of eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-MCP-1 and pcDNA3.1(+)-Gro α . Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(11):2623-2626

摘要

目的: 构建并鉴定真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α .

方法: 据 GeneBank 中大鼠 MCP-1 和 Gro α cDNA 序列设计并合成引物, 提取急性胰腺炎模型大鼠总 RNA, RT-PCR 扩增, 并将扩增产物 TA 克隆至 pGEM-T easy 载体, 然后分别双酶切 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 回收目的片段再克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(+).

结果: pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒构建完成后, 用限制性内切酶、PCR 及 DNA 序列分析等多种方法进行鉴定, 证实其构建成功.

结论: pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒构建成功, 为进一步研究该真核表达质粒的免疫保护效果及制备急性胰腺炎 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α DNA 疫苗奠定了基础.

任玥欣, 宋于刚, 陈学清, 智发朝, 钟世顺, 南清振, 武金宝, 崔忠林. pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达质粒的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2623-2626
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2623.asp>

0 引言

急性胰腺炎是临床常见病, 重症胰腺炎死亡率可高达 17-20%, 其发病机制尚不完全清楚^[1-3]. 以往的观点认为, 胰腺炎是一种自身消化性疾病, 是由胰酶激活并自身消化所致. 但近来的研究结果发现, 胰腺腺泡细胞在接受刺激后, 可以分泌大量的炎性因子^[4-5]; 急性胰腺炎作为炎症的一种形式, 炎性因子在其发病中可能占居着主导作用^[6-11]. 我们用基因芯片技术, 研究了早期急性胰腺炎中的基因变化, 发现实验性大鼠急性胰腺炎早期诱导腺泡细胞高表达某些基因, 其编码翻译产物可被分泌入胰液或细胞间隙. 促炎因子多数在模型制备后 2-3 h 开始高表达, 但其中单核细胞趋化因子

(Monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、生长调节致癌基因 α (Growth-related oncogene α , GRO- α)被快速诱发高表达。我们构建真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 的目的, 在于进一步明确 MCP-1 和 GRO- α 在急性胰腺炎发病中的作用, 并为研制 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 急性胰腺炎 DNA 疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌DH5 α 由本研究所保存。pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司, 高效真核表达载体 pcDNA3.1 (+)为 Invitrogen 公司产品。MCP-1引物根据基因库 AF058786 (*Rattus norvegicus* JE/MCP-1 mRNA, complete cds)原始序列, 由 nt64-nt607; Gro α 引物据基因库 NM_030845 (*Rattus norvegicus* gro)原始序列, 由 nt3-nt448; 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.22 上游引物设计加入 *Bam* H I 限制性酶切位点, 由上海博亚生物公司合成。引物序列为 MCP-1 上游: 5' GGA TCC ACC ACT ATG CAG G 3', 下游: 5' TTC TAG TAT TCA TGG AAG GGA 3'; Gro α 上游: 5' GGA TCC AGC TCC AGC ACT C 3', 下游: 5' ATA AAT AGG ACC CTC AAT AGA AA 3'。

1.2 方法 ♂ Wistar 大鼠 18 只, 体重 200-280 g, 由南方医科大学动物中心提供, 清洁级, 由抽签随机分为 3 组 ($n = 6$), 即正常对照组、蛙皮素组 (C-9026, Sigma) (C 组) 及牛磺胆酸组 (T 组)。C 组: 禁食过夜 (> 12 h), 超大剂量蛙皮素 (10 μ g/kg) 静脉注射, 注射后 1 h、2 h、4 h 各以过量的戊巴比妥处死大鼠。T 组: 禁食过夜, 常规麻醉, 在无菌操作下开腹, 作上腹正中切口 3 cm 左右, 找到胃十二指肠交界处, 再向下寻找到胰胆管十二指肠开口处。在左右肝管汇合处以小动脉夹夹闭以防止向肝脏方向反流, 将 4.5 号针头平面朝上于胰胆管十二指肠开口处行被膜下穿刺, 并向胰管方向推进约 2-3 mm, 用另一血管夹固定针头, 将生理盐水稀释的 10 g/L 牛磺胆酸 (T-4009, Sigma) 50 μ L 缓慢逆行推注至胰管中 (> 20 s), 使整个胰胆管均匀隆起, 退出针头, 即用手压迫进针处约 3-5 min, 3-5 min 后去除肝总管动脉夹, 关腹, 并同时开始计时观察。造模后 1 h、3 h 分别以过量的戊巴比妥处死大鼠, 取胰腺组织进行组织学分析、水肿评价及总 RNA 制备。常规组织学处理, 用 PBS (pH 7.4) 缓冲的 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋及 HE 染色。常规切片, 光镜观察。

1.2.1 总 RNA 提取、逆转录及 PCR 扩增 用 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 一步法提取胰腺总 RNA, 并用 RNeasy spin column (Qiagen Inc., Valencia, CA) 进一步纯化总 RNA, 并用以此为模板制备 MCP-1、Gro α 片段。RT-PCR 简要步骤: 用 cDNA 合成试剂盒 (Superscript Choice System, Invitrogen)、以 3' 端加有

T7RNA 启动子的 24 寡脱氧胸腺嘧啶 (oliga(dT)) 为引物, 总 RNA 5 μ g 被逆转录为双链 cDNA; 随后分别应用各自相对应引物, 用 Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶 (大连 Takara 公司) 进行 PCR 反应 (95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 循环), 大量合成第二链: MCP-1、Gro α 片段。对 PCR 反应液进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 用 UVP-GD800 凝胶分析仪观察并记录结果, 选择 MCP-1、Gro α 表达较高者切胶回收目的 DNA 片段。

1.2.2 MCP-1 和 Gro α 片段 pGEM-T easy 载体克隆 扩增产物取适量回收的 MCP-1、Gro α 片段与 pGEM-T easy 载体进行 TA 克隆, 并转化 DH5 α , 经氨苄西林及 α -互补蓝白斑筛选阳性菌落, 根据 pGEM-T easy 靠近凸出 T 端 5' 上游含 *Eco* R I 酶切位点的特性, 用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Eco* R I (Promega 公司) 酶切做初步鉴定, 并将构建好的重组体命名为 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α , 送上海博亚试剂公司测序。

1.2.3 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达载体的构建 质粒提取、酶切、连接、感受态细胞的制备及转化等常规实验技术按《分子克隆实验指南》相关章节进行。简要步骤: 先将 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 重组体用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 限制性内切酶双酶切, 然后切胶回收酶切产物。再将 pcDNA3.1(+)-空载体用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切, 并切胶回收酶切产物。按照载体和目的基因摩尔比 1:6 的比例 T₄ 连接酶 (Promega 公司) 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 DH5 α 感受态细菌, 培养观察。将克隆成功的重组质粒命名为 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 。随机挑取转化成功菌落, 并抽提质粒进行双酶切鉴定。将鉴定含有插入目的基因的阳性克隆送上海博亚公司测序鉴定。

2 结果

2.1 蛙皮素和牛磺胆酸快速诱发大鼠急性胰腺炎 给予实验动物高剂量蛙皮素和逆行性牛磺胆酸注射, 导致胰腺组织破坏, 造模后 1h 内可见腺泡细胞破坏, 3-4 h 后更明显, 并可见组织水肿, 这表明两种急性胰腺炎模型均已成功建立。

2.2 MCP-1 和 Gro α 基因目的片段的扩增和 TA 克隆双酶切鉴定结果 对照 DNA 相对分子质量标准, 分别扩增出的约 544 bp 和 446 bp, 与预计片段大小相同 (图 1)。PCR 产物经纯化回收后与 pGEM-T easy 载体连接, 转化 DH5 α 挑取阳性菌落, 将质粒纯化后经双酶切鉴定重组体。紧邻 pGEM-T easy 载体克隆位点上下游约 10 bp 处各有一个 *Eco* R I 酶切位点, *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切 pGEM-MCP-1 重组体产生 3.0 kb 及约 550 bp DNA 片段者为阳性克隆, pGEM-Gro α 重组体经双酶切后产生 3.0 Kb 及约 450 bp 两特异性条带 (图 2)。

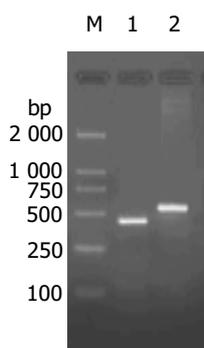


图1 MCP-1和Gro α PCR扩增结果. M: marker DL-2000; 1:Gro α ; 2: MCP-1.

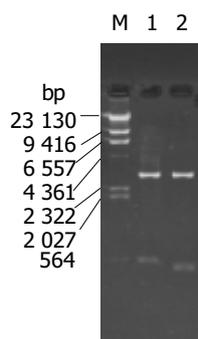


图2 重组体 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 的双酶切鉴定. M: λ -Hind III digest; 1: pGEM-MCP-1/BamHI, EcoRI; 2: pGEM-Gro α /BamHI, EcoRI.

2.3 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 真核表达载体构建的双酶切及 PCR 鉴定 将重组体 pGEM-MCP-1 和 pGEM-Gro α 双酶切后, 用琼脂糖凝胶电泳回收 MCP-1 片段和 Gro α , 与同样经 BamHI 和 EcoRI 双酶切真核表达载体 pcDNA3.1(+) 进行体外连接反应, 并对转化成功后的阳性重组体经 BamHI 和 EcoRI 双酶切电泳鉴定, 结果重组体 pcDNA3.1(+)-MCP-1 产生 5.4 kb 及 550 bp 两个特异性条带, 而 pcDNA3.1(+)-Gro α 产生 5.4 kb 及 450 bp 两个特异性条带(图 3). PCR 鉴定以 pcDNA3.1(+)-MCP-1 为模板, 用 MCP-1 上下游引物扩增出 544 bp 的产物, pcDNA3.1(+)-Gro α 为模板, 用 Gro α 上下游引物扩增出 446 bp 的产物, 而以 pcDNA3.1(+) 为模板者未能扩增出相应产物(图 3).

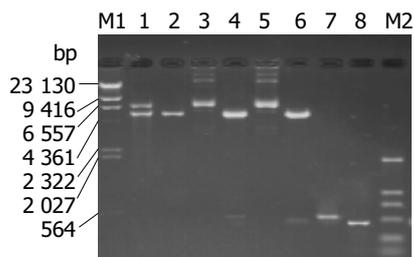


图3 重组体 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 的双酶切鉴定及 PCR 鉴定. M1: λ -Hind III digest; 1: pcDNA3.1(+); 2: pcDNA3.1(+)/BamHI, EcoRI; 3: pcDNA3.1(+)-MCP-1; 4: pcDNA3.1(+)-MCP-1/BamHI, EcoRI; 5: pcDNA3.1(+)-Gro α ; 6: pcDNA3.1(+)-Gro α /BamHI, EcoRI; 7: MCP-1 target gene; 8: Gro α target gene; M2: marker DL-2000.

2.4 测序鉴定 真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α 经上海博亚生物技术公司测序分析, 目的基因片段 MCP-1 测序结果与基因库 AF058786(Rattus norvegicus JE/MCP-1 mRNA, complete cds) 完全一致, 目的基因 Gro α 测序结果与基因库 NM_030845(Rattus norvegicus gro)nt92-nt94 序列不同, 测得序列为 CTG, 而 GenBank 中序列为 TGC, 经重复多次实验及多次测序, 均为此结果, GeneBank 中 NM_030845 nt21-nt23 序列有误.

3 讨论

急性胰腺炎关键的启动因素是腺泡细胞内胰酶活化导致胰腺自身消化^[12-14]. 而腺泡细胞接受刺激后可分泌大量的炎性因子并促进炎性细胞浸润, 导致局部炎症反应. 细胞因子及其他化学性炎症递质活化、释出进入血液循环, 形成全身炎症反应. 因此, 炎症递质在胰腺炎及随后的全身炎症反应的发病机制中起重要作用. 我们对实验性急性胰腺炎的基因芯片研究也表明: 趋化因子在腺泡损伤后短时间内即可表达增高, 可能是最早引导白细胞移向胰腺损伤区域的关键刺激, 而不同的趋化因子对不同的白细胞亚群具有趋化和活化效应.

趋化因子是一族小分子(8-10 ku)、可诱导、分泌性的细胞因子, 按结构分为 CXC 和 CC 亚族, CXC 趋化因子可以进一步分为两组, 一组包含保守的氨基酸序列 ELR, 另一组没有此结构单元. 包含 ELR 结构单元的 CXC 趋化因子, 包括几种中性粒细胞趋化因子和激活因子, 如 GRO- α 、IL8 和巨噬细胞炎症蛋白 2 (MIP2), 而缺乏 ELR 结构单元者很少有中性粒细胞激活活性. CC 趋化因子可趋化单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和树突状细胞, 如单核细胞趋化蛋白 1(MCP1), 主要作用于单核细胞. 趋化因子受体属视紫红质超家族, 跨膜与 G 蛋白耦联, 配受体结合使细胞内钙浓度升高和蛋白激酶 C 活化.

急性胰腺炎时胰腺局部损伤和由局部损伤到全身炎症反应的发展中, 中性粒细胞起到重要作用. 多篇文献报道: 应用抗中性粒细胞抗体对抗血液循环中的中性粒细胞可减轻实验性急性胰腺炎的胰腺损伤并保护肺部不受损伤^[15-17]. 在多种炎症损伤动物模型中, GRO- α 可诱导中性粒细胞聚集, 对 GRO- α 特异性拮抗可减轻炎症反应^[18-21]. 因此, GRO- α 可能成为急性胰腺炎的治疗靶点.

Grady *et al*^[5]应用 mRNA 差异显示、Northern blotting 分析和免疫荧光等方法在体内、体外实验中均证明: 腺泡细胞表达趋化因子 MCP1 是急性胰腺炎发病中的早期事件. Brady *et al*^[22]的研究表明, 经给予过量蛙皮素或逆行性胆胰管注射胆盐诱导的大鼠实验性急性胰腺炎中, 造模后 1 h 即可检测到胰腺组织的 GRO- α 和 MCP1 mRNA 表达, 表明 GRO- α 和 MCP1 是急性胰腺炎中的早期炎症递质. 我们的基因芯片研究也证实了这

一点,因此,趋化因子 GRO- α 和 MCP1 可能成为急性胰腺炎中抗炎治疗的理想靶点. Sckido *et al*^[23] 研究表明,用阻断抗体或受体拮抗剂中和 IL-8 的作用可以减轻局部和全身炎症反应. DNA 疫苗作为一种新型疫苗已引起人们广泛的注意. DNA 疫苗在宿主细胞内表达目的抗原,抗原经与自然感染相似的过程加工、修饰后,可直接与 MHC I 类和 II 类分子结合,引发特异性的细胞免疫和体液免疫. 与传统疫苗相比, DNA 疫苗易于构建,没有减毒病原体可能在体内复制致病的危险,且可根据分子生物学和免疫学原理改良抗原,以降低致病性或改变抗原性^[24-30]. 我们成功构建了针对大鼠的真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-MCP-1 和 pcDNA3.1(+)-Gro α . pcDNA3.1(+)-质粒含有人类巨细胞病毒(CMV)的高效启动子和增强子,是一种外源基因在哺乳动物细胞中高效表达及研制 DNA 疫苗的理想载体. 本研究为进一步明确急性胰腺炎早期分子机制和探索其基因治疗打下了实验基础. 并且我们在实验中意外发现: Genbank 中 NM_030845 nt21-nt23 序列有误.

4 参考文献

- 1 Lerch MM, Gorelick FS. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med Clin North Am* 2000;84:549-563
- 2 Steer LM. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Ital Chir* 1995;66:159-163
- 3 Steer ML, Meldolesi J. Pathogenesis of acute pancreatitis. *Annu Rev Med* 1988;39:95-105
- 4 Bhatia M, Brady M, Kang YK, Costello E, Newton DJ, Christmas SE, Neoptolemos JP, Slavin J. MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:G77-G85
- 5 Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1966-1975
- 6 Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G1197-G1208
- 7 Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002; 122:448-457
- 8 Cook JW, Karakozis S, Kim D, Provido H, Gongora E, Kirkpatrick JR. Interleukin-10 attenuates proinflammatory cytokine production and improves survival in lethal pancreatitis. *Am Surg* 2001;67:237-241
- 9 Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF-kappaB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:674-683
- 10 Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):G1402-G1414
- 11 Satoh A, Shimosegawa T, Fujita M, Kimura K, Masamune A, Koizumi M, Toyota T. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. *Gut* 1999;44:253-258
- 12 Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 1): G1010-G1017
- 13 Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen O. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13126-13131
- 14 Yang BM, Demaine AG, Kingsnorth A. Chemokines MCP-1 and RANTES in isolated rat pancreatic acinar cells treated with CCK and ethanol in vitro. *Pancreas* 2000; 21: 22-31
- 15 Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-2163
- 16 Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML. The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. *Int J Pancreatol* 1998;24:77-83
- 17 Murakami H, Itoh K, Itoh T, Harada A, Nonami T, Takagi H. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis. *Arch Surg* 1995;130:93-98
- 18 Hirasawa N, Watanabe M, Mue S, Watanabe K, Tsurufuji S, Ohuchi K. Induction of neutrophil infiltration by rat chemotactic cytokine (CINC) and its inhibition by dexamethasone in rats. *Inflammation* 1992;16:187-196
- 19 Yamasawa H, Ishii Y, Kitamura S. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Inflammation* 1999;23:263-274
- 20 Liu YY, Watanabe K, Miyasaka M, Tsurufuji S, Tsuchiya M. Rat CINC/gro: a novel mediator for locomotive and secretagogue activation of neutrophils in vivo. *J Leukoc Biol* 1994;55:652-657
- 21 Davenpeck KL, Zagorski J, Schleimer RP, Bochner BS. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *J Immunol* 1998;161:6861-6870
- 22 Brady M, Bhatia M, Zagorski J. CINC and MCP-1 expression in early acute pancreatitis (Abstract). *Pancreas* 1999; 19: 416
- 23 Sckido N, Mukaido N, Harada A. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin 8. *Nature* 1993;365:654-657
- 24 McDonnell WM, Askari FK. DNA vaccines. *N Eng J Med* 1996; 334:42-45
- 25 孙波, 何苗, 杨骅, 金晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申. 携带幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白活减毒鼠伤寒沙门菌口服重组 DNA 疫苗株的构建. *世界华人消化杂志* 2004;12:1317-1320
- 26 聂青和. 基因疫苗的基础研究及应用现状. *世界华人消化杂志* 2003;11:125-129
- 27 孙利, 周永兴, 郝春秋, 冯志华, 赵君, 胡沛臻, 付勇, 马福成, 常吉庆, 王九平, 聂青和. DNA 疫苗对小鼠 HCV-C 皮下移植瘤的防治. *世界华人消化杂志* 2003;11:165-168
- 28 杜德伟, 周永兴, 冯志华, 姚志强, 李光玉. IL-12 及 HBV 基因疫苗共同免疫小鼠的效果. *世界华人消化杂志* 2000;8:128-130
- 29 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒 HBsAg 重组疫苗与表面抗原 DNA 疫苗诱导 H-2b 小鼠免疫应答的实验研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:137-140
- 30 王全楚, 周永兴, 姚志强, 冯志华. 不同载体及靶基因对乙型肝炎病毒 DNA 疫苗免疫效果的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8: 289-291