

应用抑制性消减杂交技术筛选双环醇调节靶基因

王建军, 纪冬, 成军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花

王建军, 纪冬, 成军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

王建军, 男, 吉林省人, 汉族, 1975-6-17生, 医师, 1999年毕业于第一军医大学, 获得医学学士学位, 现为军医进修学院内科传染病专业2001级硕士学位研究生, 主要从事传染病临床与病毒性肝炎的发病机理研究。

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, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and cloning of genes differentially expressed in HepG2 cells treated with bicyclol by suppression subtractive hybridization

Jian-Jun Wang, Dong Ji, Jun Cheng, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang

Jian-Jun Wang, Dong Ji, Jun Cheng, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070690; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No.01MB135.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To construct a subtractive cDNA library of genes differentially expressed in human hepatocarcinoma cell line HepG2 cells treated with bicyclol using suppression subtractive hybridization (SSH) technique and to clone genes associated with its regulation effects.

METHODS: The mRNA was isolated from HepG2 cells treated with bicyclol and dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively, and then cDNA was synthesized. After restriction enzyme RsaI digestion, small sizes cDNA were obtained. Tester cDNA was subdivided into two portions and each was ligated with different cDNA adaptor. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent nested polymerase chain reaction (PCR) twice, the DNA fragment was subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive cDNA library. Amplification of the library was carried out with E. coli strain JM109. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after

colony PCR.

RESULTS: The subtractive cDNA library of genes differentially expressed in HepG2 cells treated with bicyclol was constructed successfully. The amplified library contained 46 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-1 000 bp inserts. Thirty clones were analyzed by sequencing and bioinformatics. fourteen known genes were obtained.

CONCLUSION: A subtractive cDNA library of genes differentially expressed in HepG2 cells treated with bicyclol using SSH technique is constructed successfully, which brings some new clues for studying the regulation mechanism of bicyclol in vivo.

Wang JJ, Ji D, Cheng J, Liu Y, Yang Q, Dang XY, Wang CH. Screening and cloning of genes differential expressed in HepG2 cells treated with bicyclol by suppression subtractive hybridization. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):851-854

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术构建双环醇处理的人肝癌细胞系 HepG2 差异表达基因的cDNA消减文库, 筛选并克隆双环醇调节相关基因, 阐明双环醇对肝细胞调节作用的分子生物学机制。

方法: 以双环醇处理 HepG2 细胞, 同时以二甲基硫氧化物(DMSO)处理的相同细胞系作为对照; 24 h后制备细胞裂解液, 提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 RsaI 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多聚酶链反应(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 扩增后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建双环醇处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到 46 个白色克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200-1 000 bp 插入片段。挑取含有插入片段的 30 个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得 14 种已知基因序列。

结论: 应用 SSH 技术成功构建了双环醇处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。该文库的建立为进一步阐明双环醇在体内的调节机制提供依据。

王建军, 纪冬, 成军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术筛选双环醇调节靶基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):851-854
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/851.asp>

0 引言

双环醇(商品名:百赛诺)是由中国医学科学院药物研究所研发,北京协和药厂生产,经国家药品监督管理局批准上市的国家一类抗肝炎化学合成新药.该药是我国第一个有国际独立知识产权的国家一类新药.双环醇对各种原因引起的肝损伤有明显的保护作用.对于慢性肝炎,双环醇对丙氨酸转氨酶(ALT)升高的患者疗效显著,而且安全性好,近年来广泛应用于病毒性肝炎的治疗中.虽然在临床上取得了一定的疗效,但是起作用的分子生物学机制没有进行系统的研究.为了阐明双环醇作用的分子生物学机制,我们拟对双环醇作用的靶基因进行筛选.抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)是1990年代后期建立的一种基因克隆的新技术,可以快速有效地检测到差异表达的基因.本项研究应用SSH技术,构建双环醇作用于人肝癌细胞HepG2后差异表达基因的cDNA消减文库,筛选并克隆双环醇的免疫调节基因,并应用生物信息学(bioinformatics)技术初步获得其基因全长序列.为深入了解双环醇病毒性肝炎的治疗过程中的作用机制提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 主要试剂及载体 人肝癌细胞系 HepG2 细胞及大肠杆菌 JM109(本室保存), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech), 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-T 载体(Promega). DNA 序列测定由上海博亚公司完成.

1.2 药物处理及 mRNA 提取 双环醇为二甲基硫氧化物(DMSO)溶液.在35 mm培养皿中常规培养 HepG2 细胞,细胞生长至对数期时分别将双环醇及 DMSO 加入细胞培养液中,使双环醇终浓度达到 1×10^{-5} M/L, 24 h 后收获细胞.使用 mRNA Purification 试剂盒,直接提取双环醇及 DMSO 处理的 HepG2 细胞 mRNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计分别进行定性、定量分析.

1.3 消减杂交文库的建立 采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行:以双环醇及 DMSO 处理的 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.

1.4 消减文库扩增及克隆分析 扩增产物与 pGEM-T 载

体连接,转化 JM109 感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落,增菌,以 pGEM-T 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增,证明含有插入片段后(200-1 000 bp),测序.应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析.

2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提.紫外分光检测显示,双环醇及 DMSO 处理的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.28 μg 和 4.35 μg, A260/A280 = 1.89. 1.0% 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 质优量足.

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤.将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增,产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定.结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接.

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别以消减及未消减 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 μL 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,见图 1.

M 1 2 3 4 5 6 7 8

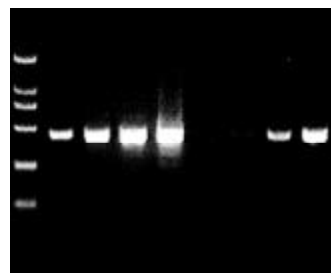


图1 消减效率分析结果. 1-4: 未消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33.

2.4 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 85 个克隆中几乎均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段,见图 2.

2.5 cDNA 测序与同源性分析结果 随机挑选 30 个克隆测序,与 GenBank 数据库进行初步比较.应用生物信息学技术分析发现,其余 22 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(98-100%),共编码 14 种基因.8 个克隆为人染色体上的序列,不与任何已知功能的基因同源,

关于他们的具体基因归属仍需进一步研究分析. 详细结果见下表 1.

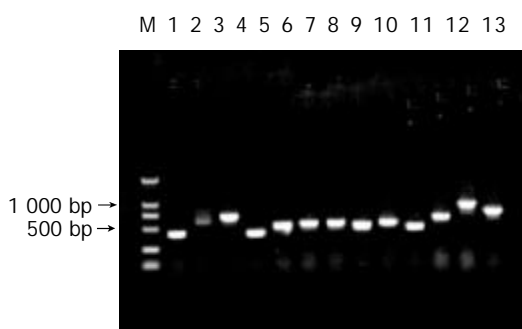


图 2 部分克隆(1-13)菌落 PCR 鉴定电泳图.

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白基因	相同克隆数	同源性
组蛋白 H2A	2	100%
v-fos 转换效应蛋白 (Fte-1)	1	100%
翻译起始因子	1	100%
胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP1)	1	100%
羧肽酶 N	1	99%
真核翻译延长因子 1	2	100%
铁蛋白重链多肽	1	98%
伴侣蛋白 10 相关蛋白 (EPFP1)	1	99%
根蛋白 (RDX)	1	100%
开心蛋白(yippee protein)	1	99%
惟一锌指(OZF)基因	1	99%
腺苷酸环化酶相关蛋白(CAP)	1	98%
线粒体蛋白	3	98-100%
核糖体蛋白	5	98-100%
人类染色体克隆	8	98-100%

3 讨论

百赛诺(双环醇片)是我国第一个有国际独立知识产权的国家一类新药. 双环醇对各种原因引起的肝损伤有明显的保护作用. 近年的研究发现: 双环醇可保护扑热息痛导致的急性肝损伤, 使肝脏能量代谢和磷脂代谢趋于正常, 并对损伤的线粒体功能有显著的保护作用^[1]. 双环醇对刀豆蛋白 A(Con A)引起的小鼠肝细胞核 DNA 损伤具有明显的保护作用^[2]. Lu et al^[3]通过对小鼠的研究发现, 双环醇可以通过提高肝细胞对黄曲霉毒素 B1 (AFB1)的解毒能力来对抗 AFB1 对肝细胞的毒性作用. 基于双环醇对肝细胞的保护作用, 目前双环醇广泛的应用于病毒性肝炎的治疗中. 国内研究提示: 双环醇对慢性丙型肝炎有很好的改善临床症状和降低转氨酶的作用, 长期服用, 无明显不良反应, 患者的耐受性好^[4]. 此外, 双环醇还可剂量依赖性保护缺血 - 再灌注引起的血清丙二醛(MDA)及尿素氮(BUN)升高、肾还原型谷胱甘肽(GSH)含量降低, 同时可诱导谷胱甘肽巯基转移酶

(GST)的活性, 缓解由于缺血 - 再灌注损伤引起的线粒体膜流动性降低, 对肾缺血 - 再灌注损伤有保护作用^[5].

抑制性消减杂交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. 我们将双环醇刺激肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以双环醇溶剂 DMSO 刺激的相同细胞系作为对照, 以 2 种细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了双环醇激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 随机挑选 30 个克隆测序分析, 有 22 个克隆与已知功能的基因高度同源(98-100%), 共编码 14 种基因. 8 个克隆为人染色体上的序列, 不与任何已知功能的基因同源, 关于他们的具体基因归属仍需进一步研究分析.

14 种已知功能的基因可分为 3 类: (1)与细胞结构、生长、增生相关的基因. 如线粒体蛋白、核糖体蛋白为细胞内结构的蛋白. 腺苷酸环化酶相关蛋白(CAP)为广泛存在, 高度保守, 具有双重功能的蛋白质, 其氨基末端是细胞响应上游的 RAS 调节信号系统, 结合腺苷酸环化酶; 而羧基末端结合球形肌动蛋白, 改变微丝系统动态的重组, 是保持正常细胞形态和生长所需要的^[6]. 根蛋白可将肌动蛋白丝连接到细胞质膜, 对细胞的运动、黏附、增生和保持细胞膜的完整性起到重要作用^[7]. 根蛋白在肝脏中主要集中于胆管细胞膜上. 由于其支持多药耐药蛋白 2(Mrp2)定位到胆管膜(BCM)上, 根蛋白对结合胆红素的分泌非常重要^[8]. 也有研究提示他可能是人类自然杀伤(NK)细胞的一种特殊的生物学标记, 并且对 NK 细胞的功能可能起到特殊的作用^[9]. v-fos 转换效应蛋白 (Fte-1): 编码参与蛋白输入线粒体功能的哺乳动物同源基因, 参与细胞周期循环^[10]. (2)维持细胞稳定, 促进损伤细胞再生、修复的基因. 组蛋白 H2A 参与细胞转录激活、DNA 修复、减数分裂和细胞凋亡等生物学作用. H2A 羧基末端结构的改变可导致染色质稳定性和 DNA 折叠功能的改变^[11]. 在细胞核内可保护常染色质免于异染色质的异位伸展的损害^[12]. Fernandes et al^[13]研究发现, 组蛋白 H2A 有较强的抗细菌感染作用. 铁蛋白重链多肽: 铁蛋白是体内主要储存铁的蛋白质, 与体内铁的代谢密切相关. 有研究发现肝脏中其水平的升高为抵抗氧化应激损伤的机制之一^[14], 近来还有研究认为铁蛋白重链基因有抗凋亡作用, 可以使肝脏免受缺血性损伤^[15]. 胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (IGFBP-1) 在肝脏和子宫内膜大量表达, 调节胰岛素样生长因子(IGF)的生物利用度, 还可能通过对 MAPK/ERK 和 C/EBP β 信号系统的影响来支持肝细胞的再生^[16]. 在肝脏中, IGFBP-1 的转录被胰岛素抑制, 因此可以作为肝脏内胰岛素敏感度的指标. IGFBP-1 的过表达可通过降低 IGF-I 和 / 或 IGF-II 的促有丝分裂活性, 抑制肝脏肿瘤的形成^[17]. 还有报道 IGFBP-1 抑制乳腺肿瘤细胞的活

动^[18]. 在 II 型糖尿病患者, 通过降低 IGF 对血管内皮细胞的潜在的促分裂作用, 血液循环中高水平的磷酸化的 IGFBP-1 可降低高血压病和心血管疾病的进展^[19]. (3) 锌指蛋白相关基因. 惟一锌指(OZF)基因: 编码 10 种锌指蛋白的基因, 在乳腺和胰腺肿瘤细胞中较正常细胞中要多^[20-21]. 开心蛋白(yippee protein)是 Roxstrom-Lindquist et al^[22]克隆出的一种果蝇属蛋白, 在真核生物中高度保守, 广泛存在于各种动物的细胞内, 具有与锌结合的特性. 羧肽酶 N(CPN)是由两个 50 kD 小亚单位和两个 83 kD 大亚单位组成的锌指样金属蛋白酶^[23], 由肝脏产生^[24], 也有人认为在胃、肺、肠、脾、肾也有表达^[25]. CPN 可以分离进入血流的激肽、血管舒张素、血小板因子这些有生物活性的多肽的羧基末端的精氨酸和赖氨酸残基^[26-27]. CPN 也可分离补体 C3a 和 C5a 羧基末端的精氨酸^[28], 极大地减少 C3a 和 C5a 的诱导平滑肌舒张、血管舒张和白细胞趋化, 以及肥大细胞释放组胺的生物学活性.

通过对上述双环醇激活相关基因的分析, 我们发现应用双环醇刺激细胞后, 一些与细胞生长、增生、维持细胞稳定及促进损伤细胞再生、修复的基因表达增高. 这些基因的作用也与体内的信号转导系统、抗肿瘤形成机制有一定的作用, 提示双环醇在维持细胞稳定、促进损伤细胞修复及抗肿瘤形成方面可能有一定作用.

4 参考文献

- 李烨, 戴国炜, 李燕, 刘耕陶. 双环醇对扑热息痛引起小鼠肝脏能量代谢和线粒体功能障碍的影响. *药学报* 2001;36:723-726
- 赵冬梅, 刘耕陶. 双环醇对刀豆蛋白 A 所致小鼠肝细胞核 DNA 损伤的保护作用. *中华医学杂志* 2001;81:844-848
- Lu H, Li Y. Effects of bicyclol on aflatoxin B1 metabolism and hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:942-945
- 姚光弼, 计焱焱, 周霞秋, 王勤环, 吴婉芬. 双环醇治疗慢性丙型肝炎的临床研究. *中华医学杂志* 2002;82:958-960
- 赵冬梅, 孙韬, 李燕. 双环醇对大鼠肾脏缺血 - 再灌注损伤的保护作用. *药学报* 2002;37:412-414
- Ksiazek D, Brandstetter H, Israel L, Bourenkov GP, Katchalova G, Janssen KP, Bartunik HD, Noegel AA, Schleicher M, Holak TA. Structure of the n-terminal domain of the adenyllyl cyclase-associated protein (cap) from dictyostelium discoideum. *Structure (Camb)* 2003;11:1171-1178
- Hoeflich KP, Tsukita S, Hicks L, Kay CM, Tsukita S, Ikura M. Insights into a single rod-like helix in activated radixin required for membrane-cytoskeletal cross-linking. *Biochemistry* 2003;42:11634-11641
- Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S, Tsukita S. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *J Hepatol* 2003;38:551-553
- Ramoni C, Luciani F, Spadaro F, Lugini L, Lozupone F, Fais S. Differential expression and distribution of ezrin, radixin and moesin in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 2002;32:3059-3065
- Lecomte F, Szpirer J, Szpirer C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (v-fos transformation effector) gene and the TNF-alpha-induced TU-11 gene, and its transcript level is altered in transformed and tumor cells. *Gene* 1997;186:271-277
- Ausio J, Abbott DW. The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 2002;41:5945-5949
- Meneghini MD, Wu M, Madhani HD. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 2003;112:725-736
- Fernandes JM, Kemp GD, Molle MG, Smith VJ. Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem J* 2002;368:611-620
- Erario MA, Gonzales S, Noriega GO, Tomaro ML. Bilirubin and ferritin as protectors against hemin-induced oxidative stress in rat liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48:877-884
- Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, Shen X, Busuttill RW, Yamashita K, Csizmadia E, Tyagi S, Otterbein LE, Brouard S, Tobiasch E, Bach FH, Kupiec-Weglinski JW, Soares MP. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003;17:1724-1726
- Leu JJ, Crissey MA, Craig LE, Taub R. Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP beta and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:1251-1259
- Lu S, Archer MC. Insulin-like growth factor binding protein-1 over-expression in transgenic mice inhibits hepatic preneoplasia. *Mol Carcinog* 2003;36:142-146
- Zhang X, Yee D. Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits breast cancer cell motility. *Cancer Res* 2002;62:4369-4375
- Heald AH, Siddals KW, Fraser W, Taylor W, Kaushal K, Morris J, Young RJ, White A, Gibson JM. Low circulating levels of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) are closely associated with the presence of macrovascular disease and hypertension in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:2629-2936
- Blottiere L, Apiou F, Ferbus D, Guenzi C, Dutrillaux B, Prosperi MT, Goubin G. Cloning, characterization, and chromosome assignment of Zfp146 the mouse ortholog of human ZNF146, a gene amplified and overexpressed in pancreatic cancer, and Zfp260 a closely related gene. *Cytogenet Cell Genet* 1999;85:297-300
- Puissant C, Lennaouar M, Le Chalony C, Goubin G, Houdebine LM. OZF gene expression in growing mouse and rabbit mammary gland and in rabbit mammary cells and Nb2 cells under prolactin action. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38:543-552
- Roxstrom-Lindquist K, Faye I. The Drosophila gene Yippee reveals a novel family of putative zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes. *Insect Mol Biol* 2001;10:77-86
- Levin Y, Skidgel RA, Erdos EG. Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I). *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4618-4622
- 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:73-76
- Sato T, Miwa T, Akatsu H, Matsukawa N, Obata K, Okada N, Campbell W, Okada H. Pro-carboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J Immunol* 2000;165:1053-1058
- Erdos EG, Sloane EM. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem Pharmacol* 1962;11:585-591
- Belew M, Lindeberg GB, Porath J, Saldeen T, Wallin R. Structure-activity relationships of vasoactive peptides derived from fibrin or fibrinogen degraded by plasmin. *Biochim Biophys Acta* 1980;621:169-178
- Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest* 1970;49:2427-2436