

SUMO-1 siRNA对肝癌细胞SMMC-7721 *p53*基因表达的影响

郭武华, 袁丽华, 肖志华, 罗良平, 余婷, 张吉翔

■背景资料

SUMO修饰调节许多和癌症发生发展相关蛋白质的功能, 在癌症的发生发展中发挥重要的作用。前期研究发现, 在肝癌细胞株及临床肝癌标本中SUMO-1基因均显著高表达, 而在癌旁肝组织中SUMO-1基因表达明显较低, 因此推测SUMO-1基因在肝癌的发生发展中具有重要的作用。

郭武华, 罗良平, 余婷, 南昌大学第二附属医院肿瘤科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006
袁丽华, 肖志华, 张吉翔, 南昌大学第二附属医院消化科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006
郭武华, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事原发性肝癌的综合治疗及肿瘤的介入治疗研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30360037

江西省教育厅科技支撑基金资助项目, No. GJJ09107

作者贡献分布: 此课题由张吉翔与郭武华设计; 研究过程由郭武华、袁丽华及肖志华操作完成; 研究所用试剂及分析工具由张吉翔提供; 数据分析由张吉翔与郭武华完成; 本论文写作由郭武华完成。

通讯作者: 张吉翔, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化科, 江西省分子医学重点实验室。

jixiangz@tom.com

电话: 0791-6292706 传真: 0791-6262262

收稿日期: 2010-03-05 修回日期: 2010-06-04

接受日期: 2010-06-07 在线出版日期: 2010-07-18

siRNA-mediated knockdown of the SUMO-1 gene down-regulates mutant *p53* expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Wu-Hua Guo, Li-Hua Yuan, Zhi-Hua Xiao,
Liang-Ping Luo, Ting Yu, Ji-Xiang Zhang

Wu-Hua Guo, Liang-Ping Luo, Ting Yu, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Jiangxi 330006, Nanchang Province, China
Li-Hua Yuan, Zhi-Hua Xiao, Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Jiangxi 330006, Nanchang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30360037; and the Science and Technology Foundation of Education Department of Jiangxi Province, No. GJJ09107

Correspondence to: Professor Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial key Laboratory of Molecular Medicine, Jiangxi 330006, Nanchang Province, China. jixiangz@tom.com

Received: 2010-03-05 Revised: 2010-06-04

Accepted: 2010-06-07 Published online: 2010-07-18

Abstract

AIM: To determine whether the SUMO-1 gene controls the expression of mutant *p53* in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721,

and whether siRNA-mediated SUMO-1 knockdown inhibits the proliferation of SMMC-7721 cells.

METHODS: Synthetic SUMO-1 siRNA was transfected into SMMC-7721 cells to silence the expression of the SUMO-1 gene. The expression level of mutant *p53* in SMMC-7721 cells was detected by RT-PCR and Western blot experiments after SUMO-1 down-regulation. SMMC-7721 cell proliferation was examined by MTT assay at 24, 48 and 72 h after siRNA transfection.

RESULTS: Both SUMO-1 and mutant *p53* were highly expressed in SMMC-7721 cells. The expression of mutant *p53* was down-regulated coincidentally with SUMO-1 silencing in SMMC-7721 cells. The expression of mutant *p53* in SMMC-7721 cells at 24, 48 and 72 h after siRNA transfection decreased by $5.73\% \pm 0.61\%$, $69.43\% \pm 1.22\%$ and $57.71\% \pm 0.94\%$, respectively. SUMO-1 knockdown inhibits the proliferation of SMMC-7721 cells. The reduced rates of cell proliferation at 24, 48 and 72 h after siRNA transfection were 70.96%, 71.57% and 81.56%, respectively.

CONCLUSION: SUMO-1 controls SMMC-7721 cell proliferation possibly by regulating the expression of mutant *p53* at the transcriptional level.

Key Words: SUMO-1; *p53*; Gene; Mutation; Hepatocellular carcinoma

Guo WH, Yuan LH, Xiao ZH, Luo LP, Yu T, Zhang JX. siRNA-mediated knockdown of the SUMO-1 gene down-regulates mutant *p53* expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(20): 2090-2094

摘要

目的: 研究肝癌细胞SMMC-7721中SUMO-1基因对突变型*p53*基因表达的影响, 及SUMO-1基因对肝癌细胞增殖的作用。

方法: 通过将有效的人工合成的SUMO-1

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

siRNA转染肝癌细胞SMMC-7721后沉默SUMO-1基因的表达. 通过RT-PCR及Western blot实验来观察SUMO-1基因表达下调后对SMMC-7721中突变型*p53*基因表达的影响. 通过MTT实验来检测SUMO-1 siRNA转染SMMC-7721后在24、48及72 h对细胞增殖的影响.

结果: 在SMMC-7721中, SUMO-1和突变型*p53*基因均高表达. SUMO-1基因表达下调后, SMMC-7721中突变型*p53*基因在mRNA及蛋白水平同步表达下调, 24、48及72 h表达下调率分别为 $5.73\% \pm 0.61\%$ 、 $69.43\% \pm 1.22\%$ 及 $57.71\% \pm 0.94\%$. 细胞增殖明显受到抑制, 24、48及72 h SMMC7721增殖抑制率分别为70.96%、71.57%及81.56%.

结论: 在转录水平, SUMO-1基因控制突变型*p53*基因的表达, 并和突变型*p53*基因共同控制SMMC-7721细胞的增殖.

关键词: SUMO-1; *p53*; 基因; 突变; 肝癌

郭武华, 袁丽华, 肖志华, 罗良平, 余婷, 张吉翔. SUMO-1 siRNA对肝癌细胞SMMC-7721 *p53*基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(20): 2090-2094
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2090.asp>

0 引言

SUMO-1是SUMO(small ubiquitin-like modifier)家族成员之一, 主要作用为参与蛋白翻译后功能的修饰, 在转录、DNA修复、核质物质转运及染色体分离等方面发挥重要的调节作用^[1,2]. SUMO-1基因与许多癌症发生发展相关因素关系密切, 增殖细胞核抗原、雌激素受体、*p53*、NF- κ B信号调节、端粒酶长度的维持都受到SUMO-1蛋白的调节. 抑癌基因*p53*在细胞的发生、分化、凋亡等方面发挥重要的作用, 如果*p53*基因活性被抑制, 细胞就容易发生癌变. *p53*基因缺失或突变可引起多种癌症的发生, 但如失活的*p53*基因重新被激活, 就可能使肿瘤的生长受到抑制甚至消亡. SUMO-1修饰可抑制*p53*基因的活性^[3,4], 促进癌症的发生发展. 研究发现, 在肝癌传代细胞株SMMC-7721中*p53*基因明显的高表达, 由于野生型P53蛋白的半衰期极短(仅约6 min), 而突变型P53蛋白相对稳定, 因此在SMMC-7721中的是突变型*p53*基因的表达^[5-7]. 我们前期研究发现在肝癌细胞SMMC-7721中SUMO-1基因明显高表达^[8], 本研究旨在探讨在

SMMC-7721细胞中SUMO-1基因和*p53*基因表达的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株SMMC-7721购自中国典型培养物保藏中心. 培养条件: SMMC-7721培养在含100 mL/L胎牛血清(PAA)、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640(Invitrogen)培养液中, 培养箱条件为37 °C, 饱和湿度, 50 mL/L CO₂. PCR热循环仪(GeneAmp® PCR System 9600), Western blot仪器(Bio-Rad), GeneGenius Match(syngene)全自动凝胶成像分析系统, 酶标仪(DENLEY MK-2). RNA提取试剂TRIzol(Invitrogen); RT-PCR试剂: Oligo(dT)(Promega), M-MLV RT 5× Buffer(Promega), dNTP(Generay Biotech), Rnase抑制剂(Promega), M-MLV逆转录酶(Promega), Master Mix(2×Taq PCR)(Tiangen), DNA ladder(Tiangen); Western blot试剂: 总蛋白提取试剂(applygen), SUMO-1一抗(兔多克隆抗体, ABZOOM), β -actin一抗(兔多克隆抗体, Santa Cruz), P53一抗(兔多克隆抗体, Santa Cruz), 二抗(羊抗兔, ZSGB-B10); Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent(Invitrogen), MTT(Sigma). 从网址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>的GenBank中获得人SUMO-1、*p53*和 β -actin基因序列, 应用Primer Premier 5.0软件设计引物, 由Generay Biotech公司合成, 各引物序列见表1. 设计三对针对SUMO-1 mRNA序列的siRNA, 靶序列编码分别为001: 5'-CAAGAACTCAAAGAATCA-3', 002: 5'-GGAAGAAGATGTGATTGAA-3', 003: 5'-CAATGAATTCACCTCAGGTT-3', 由广州锐博生物(ribobio)合成. 荧光标记的siRNA(FAM-siRNA)及阴性对照siRNA(NControl)购自广州锐博生物.

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞SMMC-7721 siRNA转染效率检测实验: FAM-siRNA分3个终浓度, 分别是30、50和100 nmol/L并设空白对照组. 按操作说明用不含血清的RPMI 1640稀释适当量的Lipofectamine™ 2000和FAM-siRNA, 混合形成FAM-siRNA转染试剂混合液, 加入肝癌细胞SMMC-7721密度为30%-40%的12孔板中, 轻轻摇晃混合. 在37 °C的CO₂培养箱中培养6-8 h即可在荧光显微镜下观察转染效率. 经重复实验确定在终浓度100 nmol/L荧光强度最强, 几乎所

■ 研发前沿

在肝癌细胞株SMMC-7721中, 突变型*p53*显著高表达. 由于SUMO-1修饰具有抑制细胞内*p53*水平的作用, 促进癌症的发生与发展, 研究SUMO-1基因表达与突变型*p53*基因表达之间的关系具有重要的意义.

■相关报道

研究显示, SUMO基因参与许多蛋白质翻译后功能的调节, 许多和癌症发生发展相关的蛋白质存在SUMO修饰. 在肝癌及其传代细胞中, SUMO-1基因显著地高表达, 抑制SUMO-1基因的表达可显著地抑制肝癌的生长.

表 1 PCR反应引物

基因	引物序列	产物长度(bp)
SUMO-1	正义 5'-AGGAGGCAAAACCTTCAACT-3'	245
	反义 5'-TTCTTCCTCCATCCCAAGT-3'	
<i>p53</i>	正义 5'-TTGAGGTGCGTGTGTTGTG-3'	335
	反义 5'-TTTATGGCGGGAGGTAGA-3'	
β -actin	正义 5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3'	621
	反义 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'	

有细胞都有荧光.

1.2.2 有效SUMO-1基因siRNA片段筛查实验: 实验分6组, 分别为待筛查的3对siRNA和阴性对照(NControl)组、脂质体(Lipofectamine)组及空白对照组(Blank组). 转染终浓度为100 nmol/L, 按操作说明进行转染, 在转染后24、48、72 h分别提取RNA及总蛋白, 采用RT-PCR及Western blot检测SUMO-1基因的表达.

1.2.3 SUMO-1基因沉默后*p53*基因的表达: 在SUMO-1 siRNA转染后24、48、72 h时分别提取RNA及总蛋白, 采用RT-PCR及Western blot检测*p53*基因的表达, 以正常细胞作为对照. 采用TRIzol提取各组SMMC-7721总RNA, 逆转录合成cDNA. PCR扩增每组*p53*基因的表达, 以 β -actin作为内参照. *p53* PCR第1阶段通过94 °C 5 min预变性, 然后94 °C 35 s、56 °C 35 s、72 °C 35 s 30个循环, 第3阶段72 °C延迟延伸7 min. 将各组SMMC-7721裂解, 提取总蛋白. SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白通过电转移至硝酸纤维素膜上. 用50 g/L脱脂奶粉封闭2 h, 用P53一抗孵育过夜, 二抗孵育2 h, 电化学发光试剂显色, 经曝光、显影、定影后通过GeneGenius Match全自动凝胶成像分析系统测条带的灰度值, 以各自 β -actin值为参照, 计算P53蛋白的表达量.

1.2.4 四甲基偶氮唑盐(MTT)实验: siRNA组: 有效的SUMO-1基因siRNA组; NControl组: 阴性对照组; Lipofectamine组: 单用LipofectamineTM 2000组; Blank组: 空白对照组. 在96孔板接种SMMC-7721, 在转染时细胞比例为30%-40%, 每组3个孔. 按操作说明转染24、48及72 h后去掉培养基, 加入用无血清1640配制的5 g/L的MTT溶液100 μ L/孔, 在37 °C的CO₂培养箱中温育4 h后去掉上清液, 每孔加入二甲亚砜溶液200 μ L, 在平板摇床上摇20 min, 使用酶标仪测定吸光度值(A), 检测波长450 nm. 本实验重复3次.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS12.0统计软件进行数据处理, 采用两样本比

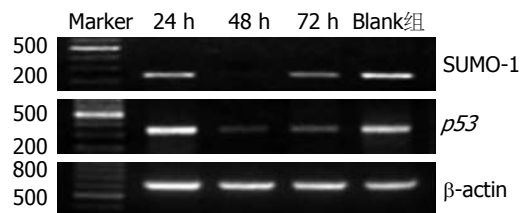
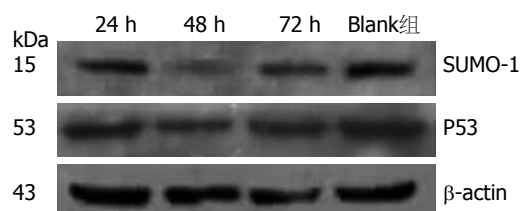
图 1 SUMO-1 siRNA干扰后SUMO-1及*p53* mRNA的表达.

图 2 SUMO-1 siRNA干扰后SUMO-1及P53蛋白的表达.

较的*t*检验进行统计分析, 以 $P<0.05$ 判定差异有统计学意义.

2 结果

2.1 SUMO-1与*p53*基因的表达 针对靶序列5'-CAAGAACTCAAAGAATCA-3'的001 siRNA SUMO-1沉默效果最好, 24 h RT-PCR测得沉默效果最高为9.80%, 48 h沉默效果最高为73.43%, 72 h沉默效果最高为46.56%, 达到实验的要求(图1). Western blot检测SUMO-1蛋白的表达变化和RT-PCR的变化规律一致(图2). *p53*基因在siRNA导致SUMO-1基因沉默后这些基因的表达也明显下调, 24、48及72 h表达下调率分别为5.73% \pm 0.61%、69.43% \pm 1.22%及57.71% \pm 0.94%, 变化规律和SUMO-1表达水平一致(图1, 2).

2.2 MTT实验各组*A*值 siRNA组和其他组*A*值在24、48及72 h均差别明显, 24、48及72 h SMMC-7721增殖抑制率分别为70.96%、71.57%及81.56%($P<0.001$, 图3, 表2).

3 讨论

SUMO蛋白是Ublp(ubiquitin-like protein)蛋白

表 2 MTT实验各组的4值

	RNA干扰组	阴性对照组	脂质体组	空白对照组
24 h	0.027 ± 0.0023	0.084 ± 0.0078	0.088 ± 0.0071	0.093 ± 0.008
48 h	0.058 ± 0.0036	0.169 ± 0.0046	0.197 ± 0.0086	0.204 ± 0.012
72 h	0.064 ± 0.0069	0.335 ± 0.0145	0.325 ± 0.0021	0.347 ± 0.022

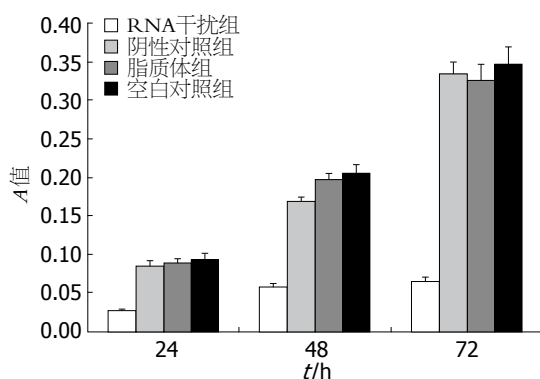


图 3 MTT实验各组4值.

家族中的一员, 主要参与蛋白翻译后功能的修饰(SUMOylation). SUMO在进化中高度保守, 目前在脊椎动物中至少发现4种SUMO家族蛋白, 分别是SUMO-1、SUMO-2、SUMO-3和SUMO-4. SUMO-2和SUMO-3结构有96%相同, 而SUMO-2/3和SUMO-1仅有46%的结构相同^[1]. SUMO和泛素竞争结合同一底物的同一个作用点^[9], 因此被SUMO修饰的蛋白不能再和泛素结合. 和其他泛素样蛋白功能不同, SUMO结合到靶蛋白后不是引起靶蛋白降解, 而是通过和靶蛋白共价结合后调节靶蛋白的功能. SUMO-1广泛参与人类癌症相关基因功能的调节, 促进癌症的发生与发展^[3,10-13]. 因此, SUMO-1和癌症的发生、发展关系密切, 是癌症发生、发展的一个重要的调节因子.

*p53*基因是一种重要的抑癌基因, 是一种控制细胞周期的重要的启动因子, 在细胞的发生、分化及凋亡中发挥重要的作用. *p53*功能缺陷、抑制或突变的细胞容易发生癌变, 在人类50%以上的肿瘤组织中均发现了*p53*基因的突变, 这是肿瘤中最常见的遗传学改变, 说明该基因的改变很可能是人类肿瘤产生的主要发病因素. *p53*基因突变后, 由于其空间构象发生改变, 失去了对细胞生长、凋亡和DNA修复的调控作用, *p53*基因由抑癌基因转变为癌基因, 转而促进癌症的发生发展. 野生型P53蛋白在细胞内代谢的时间很短, P53蛋白的代谢和MDM2(murine

double minute-2)基因关系密切. MDM2一种具有环状结构的E3连接酶, 具有结合P53蛋白的作用, 并促进P53蛋白的泛素化及降解^[3], 因此, MDM2是*p53*基因的负调节因子. MDM2也是泛素的一个结合底物, MDM2和泛素结合后导致MDM2的降解^[14], 细胞内P53蛋白的浓度增加. 但MDM2蛋白发生SUMO-1修饰后, SUMO-1使MDM2分子不能再和泛素结合, 因此在细胞内有更多的MDM2和P53蛋白结合, 再经泛素化而导致P53蛋白浓度下降^[15]. 因此, SUMO-1基因是*p53*基因的负调节因子.

在SMMC-7721中, 文献报道及我们的研究证实*p53*基因都明显高表达^[5-7], 根据野生型P53蛋白代谢规律及其功能, 推测这种P53蛋白是一种突变的类型, 并具有促进SMMC-7721增殖的作用^[16,17]. 前期的研究证实肝癌细胞及临床肝癌中SUMO-1基因明显高表达, SUMO-1可能是肝癌潜在的一个诊断和治疗的靶点^[8]. 本研究进一步证实肝癌细胞SMMC-7721中同时存在SUMO-1和*p53*基因(突变型)的表达, 说明SUMO-1蛋白并不促进突变型P53蛋白的降解, 在促进SMMC-7721的发生发展上可能具有协同的作用. 通过RNAi的方法, 抑制SMMC-7721中SUMO-1基因的表达, 可导致肝癌细胞*p53*基因表达明显下调及细胞生长明显的受到抑制, SMMC-7721的生长明显和SUMO-1及突变型*p53*基因表达有关. 由于突变型*p53*基因在mRNA及蛋白的表达存在明显的同步性, 因此可以推测SUMO-1基因对突变型*p53*基因表达的控制主要作用在转录水平, SUMO-1基因在转录水平促进突变型*p53*基因的表达. 进一步研究SUMO-1基因如何控制突变型*p53*基因的表达可进一步揭示肿瘤发生发展的规律, 并为肿瘤的治疗找到新的靶点.

4 参考文献

- Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, Catic A, Ploegh H, Gill G. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 4489-4498
- Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM.

■应用要点

通过RNAi方法抑制肝癌细胞SMMC-7721中SUMO-1基因的表达, 来抑制突变型*p53*基因的表达, 对以突变型*p53*基因为治疗靶点来抑制肿瘤的发展具有一定的应用价值.

■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 对进一步研究肝癌的发生机制, 及潜在的治疗靶点有一定的参考价值。

- 3 Carter S, Bischof O, Dejean A, Vousden KH. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 428-435
- 4 Kim KI, Baek SH. SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells* 2006; 22: 247-253
- 5 李祺福, 唐剑, 刘庆榕, 石松林, 陈祥峰, 宋建晔. HMBA诱导人肝癌SMMC-7721细胞分化过程中Nucleophosmin的表达与定位变化. *中国生物化学与分子生物学报* 2008; 24: 172-179
- 6 Xu DH, Tang J, Li QF, Shi SL, Chen XF, Liang Y. Positional and expressive alteration of prohibitin during the induced differentiation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5008-5014
- 7 马力, 张月宁. 鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 559-562
- 8 郭武华, 袁丽华, 肖志华, 张吉翔. SUMO-1基因在肝癌中的表达及意义. *重庆医学* 2009; 38: 3115-3117
- 9 Ulrich HD. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 525-532
- 10 Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 2000; 101: 753-762
- 11 Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 2005; 436: 428-433
- 12 Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, Papavassiliou AG. SUMO and estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 195-210
- 13 Xhemalce B, Riising EM, Baumann P, Dejean A, Arcangioli B, Seeler JS. Role of SUMO in the dynamics of telomere maintenance in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 893-898
- 14 Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J* 2008; 27: 1863-1874
- 15 Lee MH, Lee SW, Lee EJ, Choi SJ, Chung SS, Lee JI, Cho JM, Seol JH, Baek SH, Kim KI, Chiba T, Tanaka K, Bang OS, Chung CH. SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1424-1431
- 16 孙宝华, 武忠弼, 阮幼冰, 杨木兰. 肝细胞癌mdm2基因表达及其与p53基因突变的关系. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 291-294
- 17 Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a001107

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology*, WJG)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)