

文章编号:1000-5404(2012)16-1591-05

论著

## RI 基因真核表达载体的构建及其对人脐静脉内皮细胞的影响

李红彦,潘湘阳,姚雪,熊东梅,陈俊霞 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

**[摘要]** 目的 构建融合表达载体 pcDNA3.1-RI,并检测核糖核酸酶抑制因子(ribo nuclease inhibitor,RI)基因与血管生成素(angiotensin, ANG)的关系及对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)增殖及迁移能力的影响。方法 用 RT-PCR 方法扩增 RI 基因,酶切后将其插入 pcDNA3.1,构建融合表达载体 pcDNA3.1-RI,在脂质体介导下转染 HUVECs,RT-PCR 检测 RI、ANG 基因的 mRNA 表达水平;Western blot 检测 RI、ANG、MMP-2、MMP-9 的表达水平;CO-IP 法检测 ANG 和 RI 的相互作用,MTT 法检测细胞的增殖活力,流式细胞仪检测细胞周期分布。结果 真核表达质粒构建成功;转染 pcDNA3.1-RI 组细胞 RI 基因的 mRNA 及蛋白的表达较 2 个对照组(转染 pcDNA3.1 空载体组和未转染质粒组)均呈显著性增加( $P < 0.05$ ),而 ANG 基因的 mRNA 及蛋白的表达均降低( $P < 0.05$ ),MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平亦降低( $P < 0.05$ );CO-IP 法检测到 ANG 和 RI 在细胞内能结合;转染 pcDNA3.1-RI 质粒到 HUVECs 细胞后细胞的增殖活力明显降低( $P < 0.05$ ), $G_0 \sim G_1$  期比例明显增加,S 期减少。结论 成功构建的真核表达质粒能显著增加 RI 基因及其蛋白水平的表达,RI 可以直接在转录水平上降低 ANG 的表达,在细胞内与 ANG 结合,从而影响内皮细胞的增殖、迁移能力。

**[关键词]** 核糖核酸酶抑制因子;人脐静脉内皮细胞;血管生成素;真核表达

**[中图分类号]** R322.12;R329.23;R394.33

**[文献标志码]** A

## Construction of eukaryotic expression vector pcDNA3.1-RI and its effect on human umbilical vein endothelial cells

Li Hongyan, Pan Xiangyang, Yao Xue, Xiong Dongmei, Chen Junxia (Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct an eukaryotic expression vector of ribonuclease inhibitor (RI) gene, pcDNA3.1-RI, and to investigate the effect of pcDNA3.1-RI on the growth of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the relationship between RI and angiogenin (ANG). **Methods** RI gene segments amplified by RT-PCR and digested by restriction enzymes were inserted into pcDNA3.1 to construct the recombinant vector pcDNA3.1-RI, which was transferred into HUVECs by liposomes. The mRNA levels of RI and ANG were detected by RT-PCR, and the protein expression levels of RI, ANG, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blotting. The interaction between ANG and RI was examined by co-immunoprecipitation (Co-IP). The proliferation activity of HUVECs was detected by MTT assay, and cell cycle distribution was detected by flow cytometry. **Results** The recombinant vector pcDNA3.1-RI was successfully constructed. The mRNA and protein expression of RI in the experimental group (HUVECs transfected with pcDNA3.1-RI) significantly increased as compared with that in the control group (HUVECs transfected with pcDNA3.1) and in the blank control group ( $P < 0.05$ ). The mRNA and protein expression of ANG decreased in the experimental group, and MMP-2 and MMP-9 protein expression decreased as well ( $P < 0.05$ ). In the experimental group, cell proliferation activity of HUVECs significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the cells were arrested at  $G_1$ -S phase. The Co-IP detected the interaction between ANG and RI. **Conclusion** Eukaryotic expression vector pcDNA3.1-RI is constructed successfully, and it can increase the mRNA and protein expression of RI. RI can interact with ANG and downregulate ANG expression at the transcription level to inhibit the proliferation and migration of HUVECs.

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81071719);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5273)

**[通信作者]** 陈俊霞,E-mail: chjunxia@126.com

[Key words] ribonuclease inhibitor; human umbilical vein endothelial cells; angiogenin; eukaryotic expression

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071719) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5273). Corresponding author: Chen Junxia, E-mail: chjunxia@126.com

核糖核酸酶抑制因子(ribo nuclease inhibitor, RI)是哺乳动物细胞质中一种酸性糖蛋白,相对分子质量约为 $50 \times 10^3$ 。编码人的RI基因已定位于11号染色体短臂末端部位上,即11p15.5<sup>[1]</sup>。RI是核糖核酸酶A(RNase A)的抑制剂,能与中性及碱性RNase以1:1化学计量比紧密结合,从而抑制其酶活性<sup>[2-5]</sup>。以往的研究表明,恶性肿瘤患者血中RNase A活性升高,RI活性下降<sup>[6-7]</sup>。血管生成素(angiogenin, ANG)是1985年Feet等首先从人结肠癌细胞株HT-29的培养上清中提取的一种蛋白质,是一重要血管生成因子,由123个氨基酸组成的相对分子质量约为 $14 \times 10^3$ 的单链碱性蛋白质,在体内和体外均具有强烈的诱发血管生成的活性,能有效促进血管新生,并参与调控其他血管生成因子<sup>[8]</sup>。ANG还具有弱RNase活性,对血管内皮细胞的迁移、增殖和血管形成有广泛的影响<sup>[9]</sup>。根据cDNA序列推知,ANG与RNase A有很高的同源性<sup>[6]</sup>; Folkman和Fenselau等用X射线分析表明,ANG与RNase A有着极其相似的立体结构,二者都可以与人胎盘RI紧密结合<sup>[1,6]</sup>。但RI与ANG有更大的亲和力( $k_i = 7.1 \times 10^{-16}$  L/mol)<sup>[9-11]</sup>。本研究利用真核表达技术,通过构建特异性真核表达质粒pcDNA3.1-RI表达载体,使其在人脐静脉皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)内产生针对RI基因的高表达;探讨RI与ANG的关系及对HUVECs细胞增殖、迁移能力的影响和可能作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

质粒、载体pcDNA3.1、菌株*E. coli* DH5 $\alpha$ 、7701肝细胞由重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室保存, HUVECs细胞由重庆医科大学第一附属医院老年科实验室惠赠。

### 1.2 主要试剂

T<sub>4</sub> DNA连接酶、各种限制性内切酶、逆转录试剂盒、高保真酶、DL 2000及DL 15000均购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒提取纯化试剂盒购自Omega公司,脂质体Lipofectamine 2000和Trizol试剂购自Invitrogen公司,鼠抗人RI抗体为本实验室自制,免疫共沉淀CO-IP试剂、兔抗人ANG、MMP-2、MMP-9抗体均购自美国Santa Cruz公司,HRP标记羊抗鼠IgG、HRP标记羊抗兔IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,MTT细胞增殖与活性检测试剂购自上海生博医学生物工程科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 真核表达质粒的构建

根据PubMed中登录的人RI基因cDNA序列(NM\_002939.3),应用设计软件Primer Premier 5.0设计引物,在排除cDNA序列的酶切位点后,正义链加入了保护碱基和KOZAK序列,以在真核细胞高效表达。正义链:5'-GCTCTAGAATGAGCCTGGACATCCAGAG-3'(含Xba I酶切位点),反义链:5'-CCCAAGCTTGGAGATGACCTCAGGGAT-3'(含Hind III酶切位点)。为了构建融合表达质粒反义链已去掉终止子。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。从7701人类正常肝细胞内提取RNA,然后用RT-PCR方法扩增出RI基因,切胶回收,用Xba I和Hind III对其双酶切,把酶切后的RI基因片段与经Xba I和Hind III双酶切的空载体pcDNA3.1连接,转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 扩增,提取质粒经Xba I和Hind III双酶切初步鉴定正确后,送上海生工生物工程技术有限公司测序,测序正确的质粒命名为pcDNA3.1-RI。

### 1.4 细胞培养及转染

转染前24 h,通过胰酶消化收集细胞,以 $2 \times 10^5$ /孔接种于6孔培养板。加3 ml含10%胎牛血清的DMEM培养液于每孔,于含5% CO<sub>2</sub>的37℃温箱孵育,待细胞80%左右融合时(转染时细胞应长满57%,如果转染前细胞生长不足12 h,细胞就不能很好地吸在培养皿上,与脂质体接触时易于脱落),将pcDNA3.1-RI和pcDNA3.1用Lipofectamine 2000转染HUVECs细胞,在转染后12、24、48、72 h收集细胞,用MTT法检测细胞增殖;用PI染色流式细胞术检测细胞周期;用Western blot检测RI、ANG相关蛋白表达的变化。细胞分3组:pcDNA3.1-RI组、pcDNA3.1空载体组和对照组。

### 1.5 RT-PCR法检测转染细胞的RI、ANG基因mRNA转录水平

收集转染48 h后的各组细胞,用Trizol试剂提取细胞总RNA,使用逆转录试剂盒按照两步法进行逆转录,以逆转录合成的cDNA为模板,进行PCR反应。RI基因上游引物:5'-GCTCTAGAATGAGCCTGGACATCCAGAG-3',下游引物:5'-CCCAAGCTTGGAGATGACCTCAGGGAT-3',产物长度为1 383 bp; ANG基因上游引物:5'-CCCAAGCTTATGCTGATGGGCTGGCG-3',下游引物:5'-CGGGATCCAACGGACGACGGAAAATTGA-3',产物长度为369 bp;内参GAPDH基因上游引物:5'-GCTGTCCTGTACGCCTCTG-3',下游引物:5'-TGCCGATGGTGATGACCTGG-3',产物长度为270 bp。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳分析,用Bio-Rad凝胶成像系统摄像保存,并用Quantity one定量检测。

### 1.6 转染细胞RI、ANG、MMP2、MMP9蛋白表达的检测

蛋白质提取使用试剂和储存在-20℃,经2% SDS-PAGE凝胶电泳进行分离,然后电转移至PVDF膜上,采用5%脱脂奶粉封闭2 h;分别加入兔抗人ANG抗体(1:300稀释)、鼠抗人RI抗体(1:750稀释),4℃孵育过夜;分别加入HRP标记的羊

抗兔、羊抗鼠 IgG(1:2 000 稀释),4 ℃ 孵育过夜;用增强化学发光显色系统显色。

### 1.7 细胞内 ANG 与 RI 结合能力的检测

将质粒 pcDNA3.1-RI 和 pcDNA3.1 空载体用 Lipofectamine 2000 转染 HUVECs 细胞,转染后 48 h 收获细胞,加入适量细胞裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解后取上清,分别取少量裂解液以备 Western blot 分析作阳性对照和不加 myc 抗体作阴性对照;剩余裂解液分别加 1 μg myc 抗体,4 ℃ 缓慢摇晃孵育过夜;将预处理过的 10 μl protein A 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液和阴性对照组中,4 ℃ 缓慢摇晃孵育 2~4 h,使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶连;加入 15 μl 的 2×SDS 上样缓冲液,沸水煮 5 min;通过 Western blot 加入兔抗人 ANG 抗体(1:300 稀释)确定 ANG 与 RI 结合能力。

### 1.8 转染细胞增殖活力的检测

转染前 24 h,通过胰酶消化收集细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液制成单细胞悬液,以  $1 \times 10^3$  /孔接种于 96 孔培养板,共 3 个组。将质粒 pcDNA3.1-RI 和 pcDNA3.1 空载体用 Lipofectamine 2000 转染 HUVECs 细胞,每组设 5 个复孔,同时设不加细胞只加培养液的空白对照孔,于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养;分别于培养 1、2、3、4 d 后,每孔加入 MTT 溶液,继续培养 4 h,加二甲亚砜终止培养,于酶联免疫检测仪检测 490 nm 波长下各孔光密度值[D(490)]。以时间为横坐标,D(490) 值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

### 1.9 转染细胞细胞周期的检测

转染前 24 h,通过胰酶消化收集细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液制成单细胞悬液,以  $1 \times 10^3$  /孔接种于 96 孔培养板,共 3 个组。将 pcDNA3.1-RI 和 pcDNA3.1 空载体用 Lipofectamine 2000 转染 HUVECs 细胞,48 h 后收集稳定转染的各组细胞,经 0.25% 胰酶消化后,用 PBS 洗涤,制备成细胞悬液,再用 70% 乙醇于 4 ℃ 固定 24 h 后,送重庆医科大学生命科学院检测,实验重复 3 次。

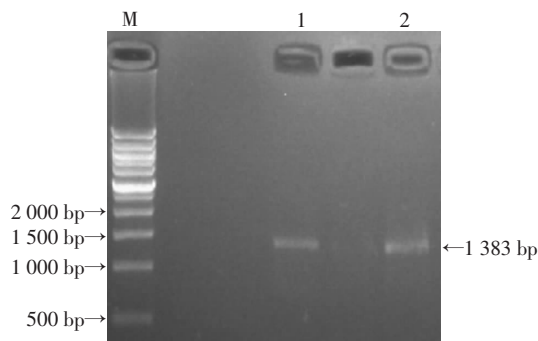
### 1.10 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,组间比较行方差分析及 *q* 检验。

## 2 结果

### 2.1 RI 基因真核表达质粒的鉴定

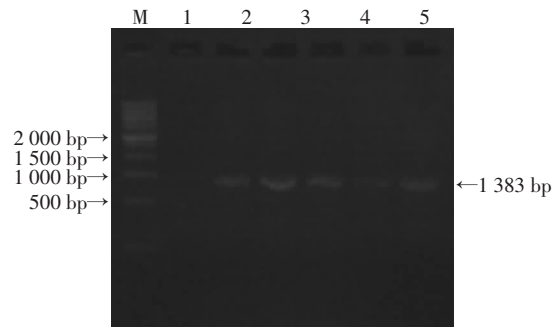
RT-PCR 方法扩增出的产物经琼脂糖凝胶电泳分析显示约 1 383 bp,与目的条带长度一致,见图 1。



M:DNA 标准(DL 15000);1,2:RT-PCR 产物  
图 1 RT-PCR 检测扩增出的 RI 基因

### 2.2 切胶回收双酶切产物

经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 383 bp 的 RI 基因条带,见图 2。

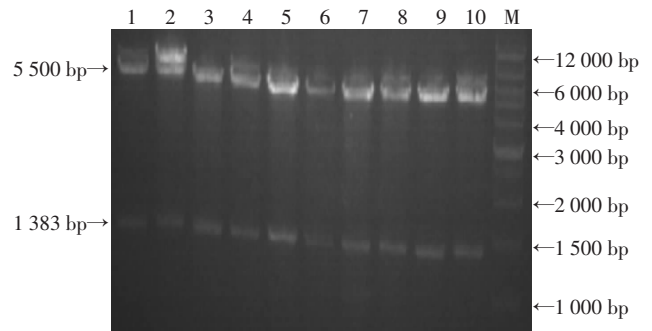


M:DNA 标准(DL 15000);1~5:RT-PCR 产物

图 2 琼脂糖凝胶电泳检测切胶回收的 RI 基因

### 2.3 RI 基因真核表达质粒的鉴定

琼脂糖凝胶电泳分析显示,重组质粒经 *Xba* I、*Hind* III 双酶切的产物可见约 1 383 bp 和 5 500 bp 的条带,见图 3。测序结果显示,重组质粒中的目的序列与设计的寡核苷酸序列完全一致,表明重组质粒构建成功。



M:DNA 标准(DL 15000);1~10:pcDNA3.1-RI 双酶切产物

图 3 重组质粒 pcDNA3.1-RI 经 *Xba* I、*Hind* III 双酶切鉴定结果

### 2.4 转染细胞 RI、ANG 基因 mRNA 的转录水平

各组细胞 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 4。可见 1 383 bp 的 RI 基因条带,369 bp 的 ANG 基因条带和 270 bp 的内参 GAPDH 基因条带;pcDNA3.1-RI 组细胞 RI 基因 mRNA 的转录水平显著增加,与 pcDNA3.1 空载体组、对照组相比,分别上升了 51% 和 57%,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 pcDNA3.1-RI 组细胞 ANG 基因 mRNA 的转录水平下降,与 pcDNA3.1 空载体组、对照组相比,分别下降了 35% 和 42%,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.5 转染细胞 RI、ANG 蛋白的表达水平

Western blot 结果经 Quantity one 相对定量分析显示,pcDNA3.1-RI 组细胞 RI 蛋白的表达水平较 pcDNA3.1 空载体组、对照组显著增加,上升率分别为 65% 和 69%,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );其 ANG 蛋白的表达水平较 pcDNA3.1 空载体组、对照组降低,下降率分别为 59% 和 57%,差异具有统计

学意义( $P < 0.05$ )。见图5。

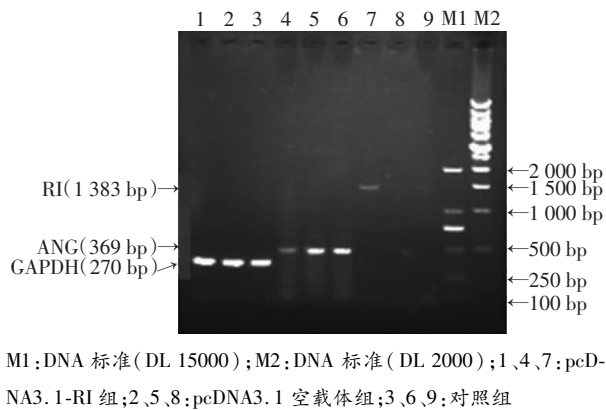
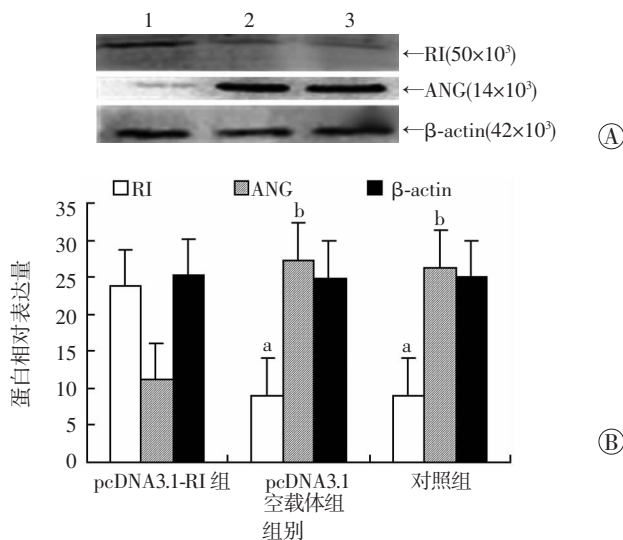


图4 各组细胞 RI、ANG 基因 mRNA 转录的 RT-PCR 结果

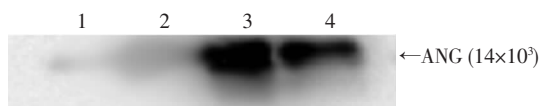


A: Western blot 检测结果 1: pcDNA3.1-R1 组; 2: pcDNA3.1 空载体组; 3: 对照组; B: 半定量分析 a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ , 与 pcDNA3.1-R1 组比较

图5 Western blot 检测各组 HUVECs 细胞 RI、ANG 蛋白的表达

## 2.6 细胞内 ANG 与 RI 结合能力

采用免疫共沉淀 CO-IP 方法,通过沉淀与 RI 融合表达的 myc 蛋白即可以在 pcDNA3.1-R1 组检测到 ANG 蛋白,见图6,结果显示 ANG 与 RI 在细胞内能相互作用。



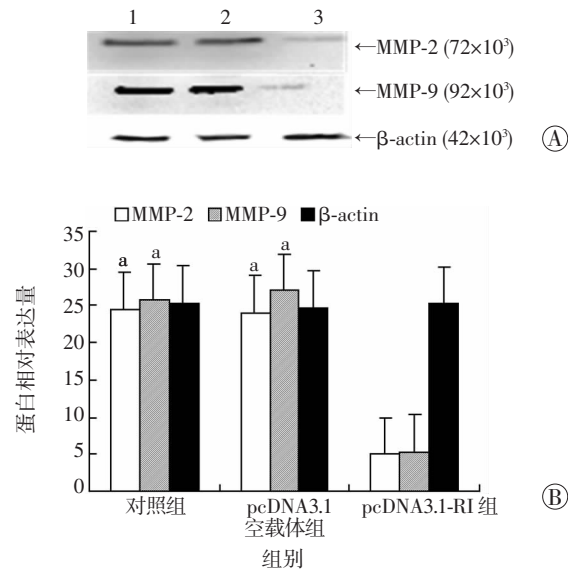
1: 阴性对照组; 2: pcDNA3.1 空载体组; 3: 阳性对照组; 4: pcDNA3.1-R1 组

图6 CO-IP 检测 ANG 与 RI 在 HUVECs 细胞内的结合能力

## 2.7 转染细胞 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平

Western blot 结果显示, pcDNA3.1-R1 组细胞 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平较 pcDNA3.1 空载体组、对照组显著降低, MMP-2 蛋白下降率分别为 79% 和 79%, MMP-9 蛋白下降率分

别为 76% 和 78%, 且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图7。

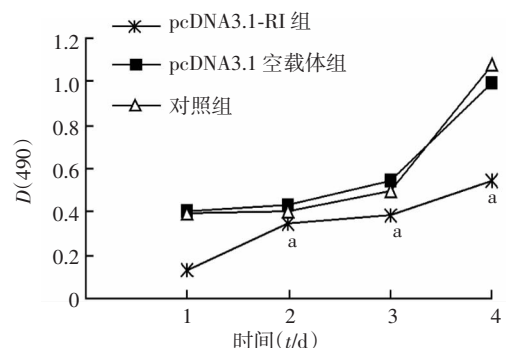


A: Western blot 检测结果 1: 对照组; 2: pcDNA3.1 空载体组; 3: pcDNA3.1-R1 组; B: 半定量分析 a:  $P < 0.01$ , 与 pcDNA3.1-R1 组比较

图7 Western blot 检测各组 HUVECs 细胞 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

## 2.8 转染细胞的增殖活力

检测结果显示, pcDNA3.1-R1 组细胞的  $D(490)$  值于接种后第2天开始, 显著低于 pcDNA3.1 空载体组和对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 pcDNA3.1 空载体组与对照组无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 见图8。转染 1、2、3、4 d 后, pcDNA3.1-R1 组的抑制率分别为 66.12%、14.71%、22.93% 和 49.15%。表明提高 RI 基因的表达可显著降低 HUVECs 细胞的增殖活力。



a:  $P < 0.05$ , 与 pcDNA3.1 空载体组及对照组比较

图8 各组 HUVECs 细胞的生长曲线

## 2.9 转染细胞的细胞周期

pcDNA3.1-R1 组与 pcDNA3.1 空载体组、对照组细胞相比, S 期细胞比例分别减少了 38.66% 和 65.37%, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),  $G_1$ 、 $G_2$  期细胞数量明显增多, S 期减少, 细胞生长阻滞。表明过表达 RI 基因可通过  $G_1 \sim S$  期阻滞, 抑制 HUVECs 细胞增殖。

### 3 讨论

血管生成的肿瘤治疗策略从理论上讲具有抗瘤谱广、不易产生耐药及药物易于到达靶部位等特点,这就为肿瘤的治疗提供了一条新思路。研究<sup>[12-13]</sup>发现,肿瘤细胞株和很多类型的肿瘤患者癌组织及血液中ANG的浓度异常升高,表明它可能与肿瘤的发生、发展和恶化密切相关。在动物实验中,血管生成素的结合蛋白质(肌动蛋白)、天然抑制剂RI、单克隆抗体或反义寡核苷酸等均可抑制肿瘤的生长和恶化,提示可通过中和血管生成素抗癌<sup>[9]</sup>。

ANG属于RNase超家族的一员,也具有RNase的活性,是血管生成因子中独具核糖核酸酶活性的因子<sup>[13-15]</sup>。化学修饰、定点突变或区域突变分析表明,该酶活性对其诱导血管生成的生物学功能必不可少的,同时还具有强烈的诱发血管生成的活性<sup>[14]</sup>。通过序列、结构和酶动力学等分析表明RI也能够与ANG紧密结合,晶体结构的X射线RI与ANG的分子识别是已知蛋白质结合中最紧密的连接之一,其结合力大于其与RNase A的结合能力约100倍<sup>[1,16-17]</sup>。为此,本实验通过高表达RI基因,研究其与ANG的关系及对入脐静脉内皮细胞增殖及迁移能力的影响,以期揭示RI在抑制血管形成中的分子机制。

本研究表明,RI基因pcDNA3.1-RI真核表达质粒高效地表达了RI基因mRNA和蛋白;ANG与RI可以在细胞内结合;RI基因可以直接在转录水平上降低ANG的表达,使ANG基因及其蛋白水平的表达大大减低,使HUVECs细胞停滞于G<sub>1</sub>期,有丝分裂减弱,从而显著抑制HUVECs细胞增殖。

综上所述,RI基因的过表达可以显著抑制血管内皮细胞的增殖及迁移,从而抑制血管生长。RI基因有望成为一个新的肿瘤血管抑制明星基因。探索RI抑制血管的作用和机制,进一步阐明RI基因的功能,可为寻找新的肿瘤血管抑制靶基因和药物提供科学依据和理论线索。

#### 参考文献:

[1] 栗印兰,李静敏.核糖核酸酶抑制因子的研究进展[J].医学综述,2007,13(5):335-337.  
[2] 朱军,高娟,李红彦,等.特异性ILK-siRNA对膀胱癌EJ细胞侵袭和迁移的影响[J].第三军医大学学报,2011,33(4):360-364.

[3] 高娟,朱军,潘湘阳,等.整合素连接激酶基因沉默对膀胱癌BIU-87细胞增殖能力的影响及其机制[J].中国生物制品学杂志,2011,24(7):785-790.  
[4] 褚颖豪,欧阳溪,何晓燕,等.重组人核糖核酸酶抑制因子腺相关病毒的构建及表达[J].中国生物制品学杂志,2010,23(8):834-838.  
[5] Chen J X, Gao Y, Liu J W, et al. Antitumor effects of human ribonuclease inhibitor gene transfected on B16 melanoma cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(6): 1219-1231.  
[6] Fu P, Chen J, Tian Y, et al. Anti-tumor effect of hematopoietic cells carrying the gene of ribonuclease inhibitor[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(3): 268-275.  
[7] Ellis G-A, Hornung M L, Raines R T. Potentiation of ribonuclease cytotoxicity by a poly(amidoamine) dendrimer[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(9): 2756-2758.  
[8] Fang S, Repo H, Joensuu H, et al. High serum angiogenin at diagnosis predicts for failure on long-term treatment response and for poor overall survival in non-Hodgkin lymphoma[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(11): 1708-1716.  
[9] Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors[J]. Important Adv Oncol, 1985, 1985: 42-62.  
[10] Furia A, Moscato M, Cali G, et al. The ribonuclease/angiogenin inhibitor is also present in mitochondria and nuclei[J]. FEBS Lett, 2011, 585(4): 613-617.  
[11] Han S, Sun X, Ritzenthaler J D, et al. Fish oil inhibits human lung carcinoma cell growth by suppressing integrin-linked kinase[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(1): 108-117.  
[12] McDonald P C, Fielding A B, Dedhar S. Integrin-linked kinase—essential roles in physiology and cancer biology[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 19): 3121-3132.  
[13] Pyatibratov M G, Tolkatheev D, Plamondon J, et al. Binding of human angiogenin inhibits actin polymerization[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 495(1): 74-81.  
[14] Johnson R J, McCoy J G, Bingman C A, et al. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein[J]. J Mol Biol, 2007, 368(2): 434-449.  
[15] 席勇,邓燕杰,李坤.核糖核酸酶抑制因子对卵巢癌裸鼠移植瘤的抑制作用研究[J].中国妇幼保健,2011,25(2):243-245.  
[16] Tripathy D R, Roy A S, Dasgupta S. Complex formation of rutin and quercetin with copper alters the mode of inhibition of ribonuclease A[J]. FEBS Lett, 2011, 585(20): 3270-3276.  
[17] Yuan Y, Wang F, Liu X H, et al. Angiogenin is involved in lung adenocarcinoma cell proliferation and angiogenesis[J]. Lung Cancer, 2009, 66(1): 28-36.

(收稿:2012-02-17;修回:2012-03-29)

(编辑 张维)