

· 论 著 ·

## iASPP 真核表达载体构建及其功能鉴定\*

陈 杰<sup>1</sup>, 杨益民<sup>1</sup>, 杨靓靓<sup>1</sup>, 杨 婷<sup>1</sup>, 蔡 云<sup>2</sup>, 辛海明<sup>2</sup>, 刘泽军<sup>2△</sup>

(1. 解放军第十六医院检验科, 新疆阿勒泰 865000; 2. 第三军医大学西南医院国际合作实验室, 重庆 400038)

**摘要:**目的 构建 P53 凋亡刺激蛋白(ASPP)家族的抑制成员 iASPP 的真核表达载体, 并将其通过脂质体转染到结肠癌细胞株 SW480 及 Lovo 中, 观察转染前后 iASPP 表达变化及其对细胞凋亡的影响。方法 将解放军第十六医院检验科测序鉴定的 pMD19-T-iASPP 质粒亚克隆至真核表达质粒 pcDNA3.1(+), 构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP, 测序鉴定后用脂质体将重组质粒转染至结肠癌细胞株 SW480 及 Lovo 中, 用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 iASPP 的表达以及用流式细胞仪检测细胞凋亡的变化情况。结果 重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP, 经酶切测序与 GenBank 上记录的人 iASPP cDNA 序列(gi 60457962)完全一致。经 pcDNA3.1(+)-iASPP 质粒转染的结肠癌细胞株 SW480 及 Lovo 的 iASPP mRNA 表达增高, 细胞凋亡率下降。结论 成功构建了重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP, 并成功在结肠癌细胞株 SW480 及 Lovo 中获得了表达, 细胞株的凋亡率下降, 提示抑制 iASPP 高表达有可能成为恢复 P53 抑癌功能的新策略。

**关键词:** P53 凋亡刺激蛋白家族抑制成员; 遗传载体; 转染; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.35.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)35-4233-03

## Construction of eukaryotic expression vector of iASPP and its identification of biological function

Chen Jie<sup>1</sup>, Yang Yimin<sup>1</sup>, Yang Liangliang<sup>1</sup>, Yang Ting<sup>1</sup>, Cai Yun<sup>2</sup>, Xin Haiming<sup>2</sup>, Liu Zejun<sup>2△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the 16th Hospital of PLA, Aletai, Xinjiang 865000, China; 2. Laboratory of International Cooperation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** Construct the eukaryotic expression vector of inhibitory member of the ASPP family(iASPP) and transfect it into colon carcinoma cell lines SW480 and Lovo by liposome. Then observe the expression of iASPP and detect the cell apoptosis by flow cytometry. **Methods** The amplified PCR product was digested and inserted into pMD19-T simple vector and subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-iASPP was transfected into colon carcinoma cell lines SW480 and Lovo by liposome, the iASPP expression was analyzed by RT-PCR. The cell apoptosis was detected by FCM. **Results** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-iASPP was constructed successfully, the gene sequence of iASPP was consistent with that reported(gi 60457962) in GenBank. The mRNA expression levels of iASPP gene of SW480 and Lovo cell lines which transfect the positive plasmid were increased, and the cell apoptosis rates were decreased. **Conclusion** We successfully constructed the recombinant expression plasmid pcDNA3.1(+)-iASPP, and the plasmid were successfully expressed in colon carcinoma cell lines SW480 and Lovo, the cell apoptosis rates of those cell lines were decreased. These facts indicated that reducing the high expression of iASPP may be a new strategy to renew the abilities of P53 tumor suppressor.

**Key words:** inhibitory member of apoptosis stimulating protein of P53; genetic vectors; transfection; apoptosis

p53 是最重要的抑癌基因之一。新发现的 P53 凋亡刺激蛋白家族(apoptosis stimulating protein of p53, ASPP)是能特异性地调节 P53 抑癌功能的蛋白质<sup>[1]</sup>。其抑制成员(inhibitory member of the ASPP family, iASPP) 是最近发现的能特异抑制 P53 抑癌功能的蛋白<sup>[2]</sup>, 现已在多种肿瘤细胞中发现 iASPP 过高表达的现象<sup>[3-7]</sup>, 提示抑制 iASPP 的高表达有可能成为恢复 P53 抑癌功能的新策略。最初报道的 iASPP 长度为 351 个氨基酸, 但作者最初的克隆实验发现编码 351 个氨基酸的 iASPP(1 056 bp)并不是其全长基因, 经过生物信息学比对得到 iASPP 的全长基因的 cDNA 应为 2 487 bp<sup>[8]</sup>。本实验利用解放军第十六医院检验科之前克隆的 iASPP 全长 cDNA 构建了 iASPP 的真核表达载体<sup>[9]</sup>, 并将其通过脂质体转染到肿瘤细胞株中, 经过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)观察阳性质粒对 iASPP mRNA 表达的影响, 最后检测了转染 iASPP 质粒

前后肿瘤细胞株凋亡的变化。为进一步研究全长 iASPP 的功能奠定了基础。

**1 材料与方法**

**1.1 细胞与细菌** 结肠癌细胞株 Lovo 由第三军医大学西南医院肿瘤科博士周进明惠赠, 结肠癌细胞株 SW480 购于上海中科院细胞库。大肠杆菌 JM109 由本室保存。

**1.2 试剂与材料** pMD19-T 载体、质粒 pMD19-T-iASPP、阴性空质粒 pcDNA3.1(+)和 pGCSi\_H1/Neo/GFP 荧光标记质粒由本室保存; RPMI-1640(Gibco 公司), 逆转录酶 M-MLV, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、凝胶 DNA 回收试剂盒(Takara 公司)、质粒抽提试剂盒(Promega 公司), 总 RNA 提取试剂(Roch 公司)、AnnexinV FITC 试剂管(晶美公司)、RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)、脂质体转染试剂(Invitrogen 公司)、佛波酯(phorbol-12-myris-tate-13-acetate, PMA)、羟乙基

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30428013, 30470675)。

作者简介: 陈杰(1976~), 硕士, 主管技师, 主要从事基因表观遗传方面的

△ 通讯作者, Tel: (023)68765945; E-mail: zejunliu@hotmail.com。

哌嗪乙硫磺酸(HEPES)、焦磷酸二乙酯(DEPC)、植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)(Sigma 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 iASPP 真核表达载体的构建与鉴定** 将质粒 pMD19-T-iASPP 使用 *Hind* III/*Eco*R I 酶切, 载体 pcDNA 3.1(+ ) 也使用 *Hind* III/*Eco*R I 酶切, 取 10  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 再切胶回收目的片段, 得到插入片段和线性载体。取 1  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。使用连接酶 T4, 将插入片段与载体连接后, 热转化至大肠杆菌感受态细胞 JM109 中, 涂布平板过夜培养菌体。挑选菌落, 提取质粒后, 取 1  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。将质粒 DNA 使用 *Hind* III/*Eco*R I 进行酶切鉴定, 取 10  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到重组真核表达载体 pcDNA 3.1(+)-iASPP, 同时将提取的质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。

**1.3.2 脂质体 DMRIE-C 介导 pcDNA3.1(+)-iASPP 和 pcDNA3.1(+ ) 分别转染 Lovo, SW480 细胞** 从孵箱中取出培养瓶, 吸取陈旧培养液, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 1 次后加入无血清无抗生素的 DMEM 高糖培养基 2 mL, 放入 5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}$ C 孵箱内培养 2 h。制备下列溶液, 溶液 A: 分别取含 10  $\mu$ g 待转染的质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP、pcDNA3.1(+ ) 加入到 1 mL 无血清无抗生素的 DMEM 高糖培养基中。溶液 B: 分别取 20  $\mu$ L 混匀的 DMRIE-C 加入 1 mL 无血清无抗生素的 DMEM 高糖培养基中, 轻轻混匀, 静置 30~45 min。分别将溶液 A 和溶液 B 混合, 用加样枪轻轻吹打几次混匀, 混合液移至 25 mL 无菌培养瓶。室温孵育 10~15 min。加入已经配制好的溶液 A 和溶液 B 的混合液 2 mL, 置 5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}$ C 孵箱内培养 4 h。每瓶换 3 mL 含 15% 胎牛血清的生长培养基。分别加入 PMA、PHA 并使其浓度为 1  $\mu$ g/mL 和 50 ng/mL 后, 置培养瓶于 5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}$ C 孵箱内孵育转染 48 h 用于进一步检测。

**1.3.3 质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP 和 pGCsi\_H1/Neo/GFP 空白质粒共转染 Lovo 和 SW480 细胞** 由于 pcDNA3.1(+ ) 不具备报告质粒的特性, 所以本实验用质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP 和 pGCsi\_H1/Neo/GFP 空白质粒共转染细胞, 成功转染的细胞可以在荧光显微镜下显示荧光。目的质粒和报告质粒之间的比例在 3 : 1~9 : 1, 本实验选择 3 : 1, 使用 6  $\mu$ g 的 pcDNA3.1(+)-iASPP 和 2  $\mu$ g 的 pGCsi\_H1/Neo/GFP 空白质粒, 转染步骤同上。

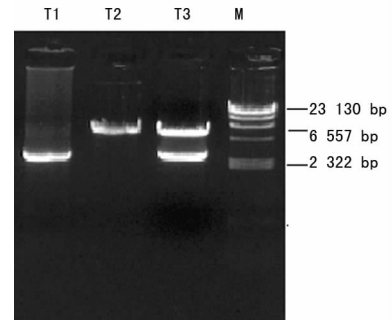
**1.3.4 RT-PCR 法检测转染后细胞中 iASPP 基因 mRNA 表达水平** 根据 Tripure 操作说明提取待测细胞总 RNA, 然后按 RT-PCR 操作方法进行 mRNA 检测。RT-PCR 扩增人 iASPP 基因家族与  $\beta$ -actin 的 cDNA 序列引物设计: 根据 GenBank 中提供的 iASPP(AJ888472) 和  $\beta$ -actin(BC14861) 的编码氨基酸的 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物, 所有引物均由上海申工生物有限公司合成。iASPP 基因 PCR 扩增参数: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min, 4  $^{\circ}$ C 保存;  $\beta$ -actin 扩增参数: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 28 个循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。iASPP 引物, 上游: 5'-TGA AGG AGA TGA ACG ACC CG-3', 下游: 5'-GGC GCA GTC AGC ATA ACC C-3'。  $\beta$ -actin 引物, 上游: 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3', 下游: 5'-CTA GAA GCA TTT GCG

GTG GAC GAT GGA GGG -3'。

**1.3.5 流式细胞仪检测细胞凋亡** 收集转染后的细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液备用。用 4  $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 250  $\mu$ L 结合缓冲液重新悬浮细胞, 并使其浓度为  $1 \times 10^6$  /mL。取 100  $\mu$ L 细胞悬液于 1.5 mL EP 管中, 分别加入 5  $\mu$ L 膜联蛋白 V-早硫氰酸荧光素(Annexin V/FITC) 和 10  $\mu$ L 20 ng/mL 的碘化丙啶(PI)溶液。混匀后室温避光孵育 15 min 或 4  $^{\circ}$ C 30 min。在反应管中加入 400  $\mu$ L PBS, 流式细胞仪 FCM 分析凋亡率。

## 2 结果

**2.1 iASPP 真核表达载体的构建** 将质粒 pcDNA 3.1(+)-iASPP 酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收 iASPP 基因产物, 测序鉴定结果与目的序列完全一致。酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图见图 1。



M: DNA 分子标记物。T1: iASPP 全长序列(约 2.5 kbp); T2: pcDNA 3.1(+)-iASPP 酶切鉴定; T3: pcDNA 3.1(+)-iASPP 质粒酶切鉴定。

图 1 重组质粒 pcDNA 3.1(+)-iASPP 酶切鉴定图谱

**2.2 质粒 pcDNA3.1(+)-iASPP 和 pGCsi\_H1/Neo/GFP 空白质粒共转染 Lovo 和 SW480 细胞的荧光鉴定** 通过阳离子脂质体 DMRIE-C 瞬时共转染 pcDNA3.1(+)-iASPP 质粒和 pGCsi\_H1/Neo/GFP 空白质粒后, 在荧光显微镜下观察细胞, 见图 2。发现部分细胞呈现荧光, 说明 Lovo 和 SW480 细胞能够用脂质体的方法进行质粒的转染。

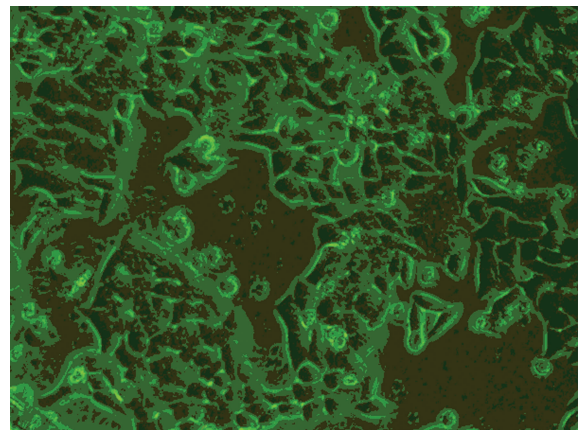
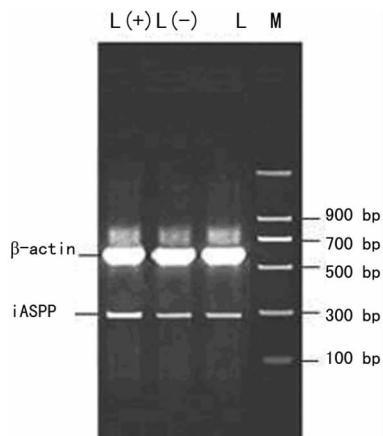


图 2 质粒共转染 Lovo 细胞后荧光显微镜观察( $\times 200$ )

**2.3 pcDNA3.1(+)-iASPP 真核表达质粒和 pcDNA3.1(+ ) 空质粒分别转染 SW480 和 Lovo 细胞后 iASPP 基因 mRNA 水平变化** RT-PCR 结果显示, 转染 pcDNA3.1(+)-iASPP 质粒的细胞 iASPP 基因 mRNA 水平都高于相应的转染空质粒的细胞和未转染质粒细胞的 iASPP 基因 mRNA 水平。Lovo 和 SW480 细胞株中转染阳性质粒的细胞株比转染阴性质粒的

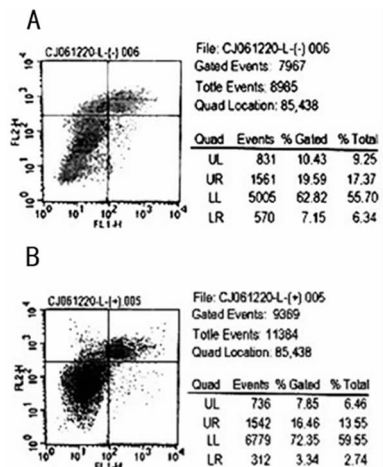
细胞株 iASPP 基因 mRNA 水平分别升高了 49.1% 和 94.4%，未转染质粒和转染了空质粒之间差别不大。Lovo 细胞转染各种质粒后 iASPP mRNA 的表达鉴定图，见图 3。



M:DNA 分子标志物;L:Lovo 未转染质粒;L(-):Lovo 转染 pcDNA3.1(+)-空质粒;L(+):Lovo 转染 pcDNA3.1(+)-iASPP。

图 3 转染质粒前、后 iASPP mRNA 表达水平

2.4 pcDNA3.1(+)-iASPP 真核表达质粒和 pcDNA3.1(+)-空质粒转染 Lovo 细胞后细胞凋亡检测结果 各组中转染阳性质粒的细胞凋亡率比转染空质粒的细胞凋亡率均降低，Lovo、SW480 细胞凋亡率分别由转染空质粒时的 7.15%、9.65% 降低到转染阳性质粒时的 3.34%、7.06%，见图 4。



A:转染 pcDNA3.1(+)-空质粒;B:转染 pcDNA3.1(+)-iASPP 真核表达质粒。

图 4 流式细胞仪检测 Lovo 细胞凋亡状况

### 3 讨论

本实验室最近的研究发现了肿瘤细胞中 ASPP1 和 ASPP2 的 mRNA 低表达与 iASPP 的高表达共存的现象<sup>[10]</sup>，Liu 等<sup>[4]</sup>，Cai 等<sup>[10]</sup> 的研究发现，iASPP mRNA 表达水平在急性白血病患者细胞中比健康人和急性白血病完全缓解者高。iASPP 基因在急性淋巴细胞白血病的表达与性别、年龄、白细胞计数、P53 亚型无关，但和 CD34 的表达有关。Bergamaschi 等<sup>[2]</sup> 检测了 8 例野生型 P53 和 ASPP 水平正常的乳腺癌患者的 iASPP 含量，结果 7 例患者的 iASPP 含量都增高，而抑制 iASPP 的活性在一系列研究中也证明能恢复 P53 凋亡细胞的生物功能<sup>[11-12]</sup>。以上结果提示 ASPP 有益于癌症患者，而 iASPP 在癌症患者中有增高的现象<sup>[13-14]</sup>。iASPP 蛋白与 P53 蛋白结合，它能抑制 P53 蛋白的凋亡功能，抑制凋亡。ASPP1

和 ASPP2 通过提高原凋亡基因的活力促进 P53 依赖的细胞死亡，iASPP 则通过与 ASPP1 和 ASPP2 竞争与 P53 的结合位点，从而阻止 P53 的细胞凋亡功能。随着研究的深入，ASPP 有可能成为一个肿瘤治疗的新靶点，因此作者考虑通过抑制 iASPP 或者激活 ASPP 的手段来提高 P53 的诱导细胞凋亡的功能。

本实验采用了 DMRIE-C 脂质体作为转染试剂，同时加入了 PHA 和 PMA 对细胞进行刺激，增强启动子活性和基因表达，但对转染效率的问题无法判断。为解决转染效率问题，在下一步实验中拟通过 G418 筛选出稳定表达的细胞株，进一步研究 iASPP 的功能，并试图找出抑制肿瘤细胞中 iASPP 高表达的策略，为以后通过对 iASPP 的调节从而恢复肿瘤细胞中 p53 的抑癌功能提供可行的手段，从而为开发基于 iASPP 的抗肿瘤药物提供新策略。

本次实验，通过将阳性质粒与阴性质粒分别转染到细胞株，用凋亡检测试剂 Annexin V-PI 对细胞进行标记再用流式细胞仪进行检测。结果可见结肠癌细胞株 Lovo 细胞凋亡率由转染空质粒后的 7.15% 降低到转染阳性质粒后的 3.34%。说明本研究构建的 iASPP 真核表达质粒有抑制细胞凋亡的作用，iASPP 表达质粒的成功构建为以后研究全长 iASPP 的生物学功能奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Samuels-Lev Y, Lu X, Bergamaschi D, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53 [J]. *Mol Cell*, 2001, 8(4): 781-794.
- [2] Bergamaschi D, Samuels Y, Lu X, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human [J]. *Nature genetics*, 2003, 33(2): 162-167.
- [3] Liu ZJ, Zhang Y, Zhang XB. Abnormal mRNA expression of ASPP members in leukemia cell lines [J]. *Leukemia*, 2004, 18(4): 880.
- [4] Liu ZJ, Lu X, Zhang Y, et al. Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in cancer cell lines retaining wild-type p53 [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(7): 1587-1590.
- [5] Cao L, Huang Q, He J, et al. Elevated expression of iASPP correlates with poor prognosis and chemoresistance/radioresistance in FIGO I b1-II a squamous cell cervical cancer [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 352(2): 361-369.
- [6] Liu Z, Zhang X, Huang D, et al. Elevated expression of iASPP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5): 3381-3388.
- [7] Liu T, Li L, Yang W, et al. iASPP is important for bladder cancer cell proliferation [J]. *Oncol Res*, 2011, 19(3/4): 125-130.
- [8] Slee EA, Gillotin S, Bergamaschi D, et al. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization [J]. *Oncogene*, 2004, 23(56): 9007-9016.
- [9] 陈杰, 辛海明, 刘泽军, 等. 人 iASPP 全长 CDS 的分段扩增、克隆及鉴定 [J]. *第三军医大学学报*, (下转第 4238 页)

常髋关节百分比的分布趋势与髋关节发育曲线<sup>[2]</sup>不完全吻合, 1~5 月龄吻合, 而 6 月龄不符合。原因可能与各月龄例数收集不均匀有关。由以上结果可看出: (1) 超声 Graf 法可有效、可靠地早发现、早诊断 DDH。通过对超声医生严格规范化的培训, 在认识髋关节的标准图像和正确测量方法后, 便可以较为准确可靠地评估该病, 且超声 Graf 法可重复操作性强, 标准化程度高, 对超声仪器要求简单, 容易在基层普及; (2) 超声髋关节筛查最佳时间为出生后 4~6 周。虽然欧洲一些国家和地区在新生儿期就进行 DDH 的筛查, 但是根据各月龄正常髋关节的百分比和髋关节生长曲线, 本研究发现, 出生后 1 个月内髋关节的生长潜力大, 假阳性率高, 容易造成过度治疗, 增加家长的精神和经济负担, 造成社会资源浪费。而婴幼儿 2 个月以后进行筛查, 则容易错过髋关节最佳生长潜力期, 易造成延误治疗, 使得治疗变得复杂, 增加患儿的痛苦, 降低治愈率。同时婴幼儿月龄越大, 家长依从性越差。

早期应用超声进行新生儿和婴幼儿髋关节检查, 实现了 DDH 患儿的早发现、早治疗。相信这一方法能更方便, 快捷地在普通儿童中筛查出异常的髋关节, 有效促进骨科医生和儿童保健医生对 DDH 的早发现, 早诊断, 提高 DDH 患儿的早诊早治率以及儿童保健及诊疗服务水平, 促进患儿康复, 降低致残率。虽然有学者提出超声筛查的假阳性率高, 容易造成过度治疗, 但是早期治疗并不是发现异常立即治疗, 对于轻度发育不良或 3 个月以内婴幼儿, 可进行简单体操锻炼或跟踪随访, 若超声或临床持续阳性则再进行干预。这样不仅有利于婴幼儿的成长, 也不会加重父母及社会的经济负担。

综上所述, 超声 Graf 法适合在大范围内进行新生儿和小婴幼儿人群中开展早期 DDH 的筛查, 适合在妇幼保健医院和社区卫生服务中心等开展儿童保健服务的单位推广使用。

#### 参考文献:

- [1] Graf R. The use of ultrasonography in developmental dysplasia of the hip[J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2007, 41 suppl 1:6-13.
- [2] Graf R. 髋关节超声检查——婴儿发育性髋脱位的诊断与治疗[M]. 王月香, 译. 2 版. 北京: 人民军医出版社, 2007, 29(11):996-998.
- [10] Cai Y, Qiu S, Gao X, et al. iASPP inhibits p53-independent apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p63/p73 on promoters of proapoptotic genes[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(8):777-783.
- [11] Lu M, Breysens H, Salter V, et al. Restoring p53 Function in Human Melanoma Cells by Inhibiting MDM2 and Cyclin B1/CDK1-Phosphorylated Nuclear iASPP [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5):618-633.
- [12] 侯露, 蔡云, 陈杰, 等. 干扰 iASPP 基因对转染 MCF-7 细胞凋亡变化的观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15

2011;85-86.

- [3] 黄冠兰, 李鑫, 王莺, 等. 超声检查技术规范程度对发育性髋关节异常诊断可靠性的影响[J/CD]. *中华超声医学杂志*: 电子版, 2010, 7(7):1134-1142.
- [4] Graf R, 赵黎. 婴幼儿髋关节超声波检查的方法和原理[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2011:44.
- [5] 杨军林, 陈立龙, 田百超, 等. 新生儿髋关节脱位超声、手法诊断价值的评价[J]. *中华骨科杂志*, 1997, 12(17):743-747.
- [6] 康斌, 朱通伯, 杜靖远, 等. 先天性髋关节脱位 B 超早期诊断价值的研究[J]. *中华骨科杂志*, 1994, 14(8):502-504.
- [7] 孟志斌, 孙材江, 李胜利, 等. 先天性髋关节脱位的 B 超与 X 线诊断的比较[J]. *海南医学院学报*, 1997, 3(4):162-166.
- [8] 刘丹, 周晓东, 赵黎, 等. 婴儿发育性髋关节异常的早期诊断[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(19):1773-1775.
- [9] 张卓, 陈曼, 王慧莉, 等. 发育性髋关节异常常规超声检查的临床诊断价值[J]. *中国超声医学杂志*, 2010, 26(12):1129-1132.
- [10] 何丽莉, 钱蕾英, 孙颖华, 等. 超声筛查婴儿发育性髋关节异常的临床价值[J]. *临床小儿外科杂志*, 2010, 9(1):64-66.
- [11] 江怡, 李欣, 杨晓琴, 等. 超声检查在小儿发育性髋关节异常筛查中的应用价值[J]. *重庆医学*, 2012, 41(8):807-819.
- [12] 黄冠兰, 李鑫, 王莺, 等. 超声筛查新生儿发育性髋关节异常[J]. *中国医学影像技术*, 2009, 25(12):2250-2253.
- [13] 王风梅, 赵虹, 李琳, 等. 早期 DDH 筛查在儿保工作中的应用价值[J]. *中外医疗*, 2012, 31(14):75-76.
- [14] 吉士俊, 周永德. 先天性髋脱位临床与研究[M]. 沈阳: 沈阳出版社, 1994:15-21.
- [15] 陈博昌. 发育性髋关节异常的超声波检查[J]. *临床小儿外科杂志*, 2003, 7(3):196-200.

(收稿日期:2013-08-18 修回日期:2013-09-15)

(上接第 4235 页)

- 2007, 29(11):996-998.
- [13] Lin BL, Xie DY, Xie SB, et al. Down-regulation of iASPP in human hepatocellular carcinoma cells inhibits cell proliferation and tumor growth[J]. *Neoplasma*, 2011, 58(3):205-210.
- [14] Lu B, Guo H, Zhao J, et al. Increased expression of iASPP, regulated by hepatitis B virus X protein-mediated NF- $\kappa$ B activation, in hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6):2183-2194.

(收稿日期:2013-09-04 修回日期:2013-10-15)