

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.003

两性多肽结构影响鲍曼不动杆菌外膜通透性的实验研究*

张 劫¹, 陈 永¹, 曾 颖^{1△}, 李秀娟²

(1. 重庆市第三人民医院老年病科 400014; 2. 重庆医科大学附属第一医院第一分院内科 400015)

[摘要] 目的 明确两性多肽结构对鲍曼不动杆菌(AB)外膜通透性的影响。方法 PCR 扩增 LysAB3 基因及删除两性多肽结构的 LysAB3-D 基因,以 pET28a(+)为载体构建重组质粒,在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达 LysAB3 及 LysAB3-D,金属离子螯合亲和层析法纯化重组蛋白。将 AB 分别经 LysAB3 及 LysAB3-D 处理后,用扫描电子显微镜观察菌体形态,荧光显微镜观察菌体中是否有绿色荧光的聚集。结果 经 LysAB3 处理后的 AB,在扫描电子显微镜下可见菌体表面粗糙、皱缩,部分裂解为碎片;在荧光显微镜下可见菌体内有绿色荧光聚集。而删除两性多肽结构的 LysAB3-D 作用 AB 后,却没有上述现象的发生。结论 两性多肽结构可增加 AB 外膜通透性,有助于裂解酶进入其中,达到抗菌目的。

[关键词] 噬菌体;裂解酶;两性多肽结构;鲍曼不动杆菌;外膜通透性

[中图分类号] Q939

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)09-1162-03

Effects of the amphiphilic peptides on membrane permeability of *Acinetobacter baumannii**

Zhang Jie¹, Chen Yong¹, Zeng Ying^{1△}, Li Xiujuan²

(1. Department of Geriatrics Medicine, the Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China;

2. Department of Internal Medicine, the First Branch, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

[Abstract] **Objective** To investigate effects of the amphiphilic peptides on membrane permeability of acinetobacter baumannii. **Methods** The LysAB3 and LysAB3-D (lack of amphiphilic peptides structure gene) was synthesized and inserted into the vector pET28a(+) to construct the recombinant expression plasmid (pET28a-LysAB3, pET28a-LysAB3-D). After expression in *E. coli* BL21(DE3) and purification with Ni²⁺-NTA Sepharose, *Acinetobacter baumannii* was observed by scanning electron microscopy and fluorescence microscope, pretreated with LysAB3 and LysAB3-D respectively. **Results** Under scanning electron microscopy, LysAB3-treated acinetobacter baumannii exhibited not only significant abnormalities, including deep roughening of the cell surface, but also FITC readily accumulated in bacteria. It was different from LysAB3-D-treated. **Conclusion** These results indicate that the amphiphilic peptides structure increase membrane permeability of acinetobacter baumannii, which helps LysAB3 degrade bacteria.

[Key words] bacteriophage; endolysin; amphiphilic peptides; *Acinetobacter baumannii*; membrane permeability

2010 年中国 CHINET 细菌耐药监测网的数据表明,鲍曼不动杆菌(*acinetobacter baumannii*, AB)菌株临床分离率已经达到革兰阴性菌总体分离率的第 3 位,其耐药率急剧上升,甚至到了无药可治的地步^[1]。噬菌体是一类细菌依赖性病毒,能在菌体内快速增殖并最终裂解细菌达到抗菌作用,但噬菌体往往只能裂解单一的细菌分离株,而不能裂解同一类细菌的其他分离株。来源于噬菌体的裂解酶则不需要特异性的识别过程,可裂解不同的细菌分离株,其裂菌谱相比噬菌体明显增宽。当前裂解酶应用于革兰阴性菌感染的研究很少,这是因为革兰阴性菌外膜通透性低,限制了裂解酶进入其中裂解细菌^[2]。但有研究指出^[3],部分裂解酶 C 端的两性多肽结构,可增加革兰阴性菌外膜的通透性,形成细菌外膜孔道,有利于裂解酶进入其中裂解细菌。本文主要对上述观点进行实验验证。

1 材料与方 法

1.1 菌株、噬菌体及试剂 AB 菌株来自重庆市临床检验中心;噬菌体 AB3 由前期分离纯化;正反向引物(上海生工生物工程公司);Nco I、Xho I、dNTP、Kod plus DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶(大连宝生物工程公司);咪唑、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG)、卡那霉素、LB 培养基、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(美国 Sigma 公司);Ni²⁺-NTA 亲和层析柱(美国 GE 公司);pET28a(+)质粒(美国 Novagen 公司)。

nate, FITC)(美国 Sigma 公司);Ni²⁺-NTA 亲和层析柱(美国 GE 公司);pET28a(+)质粒(美国 Novagen 公司)。

1.2 LysAB3 基因的表达及纯化 将前期分离纯化的噬菌体 AB3 DNA 作为模板,设计目的基因 LysAB3 的正反向引物,加入限制性内切酶 Nco I 和 Xho I 的酶切位点。加入 dNTP 及 Kod plus DNA 聚合酶进行 PCR 反应,使用回收试剂盒分离纯化 PCR 产物,使用限制性内切酶 Nco I 和 Xho I 分别酶切上述 PCR 产物和质粒 pET28a(+),加入 T4 DNA 连接酶行连接反应,构建重组质粒 pET28a-LysAB3,筛选阳性克隆测定目的基因序列。将 pET28a-LysAB3 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,接种于 LB 培养液(含卡那霉素 50 μg/mL),37 ℃ 振荡过夜培养至 OD₆₀₀ = 0.6,加 IPTG 诱导表达,离心收集菌体,超声破碎 4 ℃ 离心,上清液用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱分离纯化,经咪唑洗涤、洗脱后,收集重组蛋白,取样检测,将重组蛋白命名为 LysAB3^[4]。

1.3 删除两性多肽结构的 LysAB3-D 基因的表达及纯化 将前期分离纯化的噬菌体 AB3 DNA 作为模板,设计正反向引物,加入限制性内切酶 Nco I 和 Xho I 的酶切位点。扩增 Lys-

* 基金项目:重庆市卫计委科研基金资助项目(2013-2-097);重庆市渝中区科技计划基金资助项目(20130149)。 作者简介:张劫(1978-),副主任医师,博士,主要从事临床呼吸研究。 △ 通讯作者, Tel:13996306381; E-mail:775899006@qq.com。

AB3 基因序列前端的 354 bp, 加入 dNTP 及 Kodplus DNA 聚合酶行 PCR 反应, 使用回收试剂盒分离纯化 PCR 产物, 使用限制性内切酶 Nco I 和 Xho I 分别酶切 PCR 产物和质粒 pET28a(+), T4 DNA 连接酶进行连接反应, 构建重组质粒 pET28a-LysAB3-D, 筛选出阳性克隆, 检测重组质粒目的基因序列。将 pET28a-LysAB3-D 转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 接种于 LB 培养液(含卡那霉素 50 μg/mL), 37 °C 振荡过夜培养至 $OD_{600}=0.6$, 加 IPTG 诱导表达, 超声破碎 4 °C 离心, 上清液用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱分离纯化, 经咪唑洗涤、洗脱后, 收集重组蛋白, 取样检测, 将重组蛋白命名为 LysAB3-D。

1.4 扫描电子显微镜下观察 AB 菌体形态 AB 分别与 LysAB3、LysAB3-D 各 50 μg 混合培养 37 °C 30 min 后, 经固定、脱水、干燥和真空镀膜制样后, 扫描电子显微镜(Hitachi S-3000 N)下观察, 并设阴性对照。

1.5 AB 外膜通透性检测 采用 FITC 荧光染色的方法观察 AB 外膜通透性的改变。按 Mangoni 等^[5]所描述的方法, 将 AB 于 37 °C 的 LB 培养液振荡过夜, 直至 $OD_{600}=0.6$, 之后将细菌离心、洗涤并重悬于 PBS 缓冲液中。将 10^7 细菌分别混合 50 μg 的 LysAB3 和 LysAB3-D, 用 PBS 稀释至 100 μL, 设立阴性对照组。将上述混合物置于 EP 管 37 °C 共育 30 min 后, 倾倒在玻片上, 37 °C 静置 30 min, 保证 AB 附着于玻片上。用 PBS 液轻轻冲洗玻片后, 滴加 1 mL FITC 溶液(6 μg/mL)。静置 30 min 后, 用 PBS 液轻轻冲洗玻片, 去除未附着 FITC。随后分别用普通白光显微镜和荧光显微镜观察玻片, 了解绿色荧光探针 FITC 是否能进入菌体内。

2 结 果

2.1 LysAB3 基因的表达及纯化 扩增产物经过 Nco I 和 Xho I 双酶切后, 得到 pET28a-LysAB3 载体, 筛选阳性克隆抽提质粒并测序, 测序结果与 GenBank KC311669 中的裂解酶基因相同, 构建成功^[6]。将 pET28a-LysAB3 转化后, 经 IPTG 诱导表达, 收集菌体超声破碎, 取上清液用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱分离纯化。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-

PAGE)显示重组蛋白与预期蛋白相对分子质量 21.07×10^3 基本一致(图 1)。

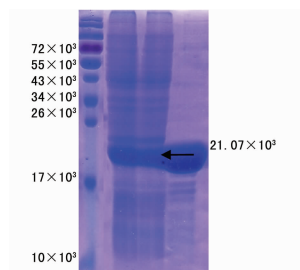


图 1 LysAB3 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

2.2 删除两性多肽结构的 LysAB3-D 基因的表达及纯化 扩增产物经 Nco I 和 Xho I 双酶切后, 得到重组质粒 pET28a-LysAB3-D, 转化后筛选阳性克隆抽提质粒测序, 比对后证明同源性 100%。将 pET28a-LysAB3-D 转化后诱导表达收集菌体超声破碎, 取上清液用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱分离纯化^[7]。SDS-PAGE 显示重组蛋白与预期蛋白相对分子质量 14.6×10^3 基本一致, 将重组蛋白命名为 LysAB3-D(图 2)。

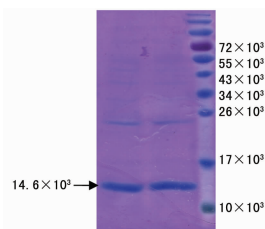


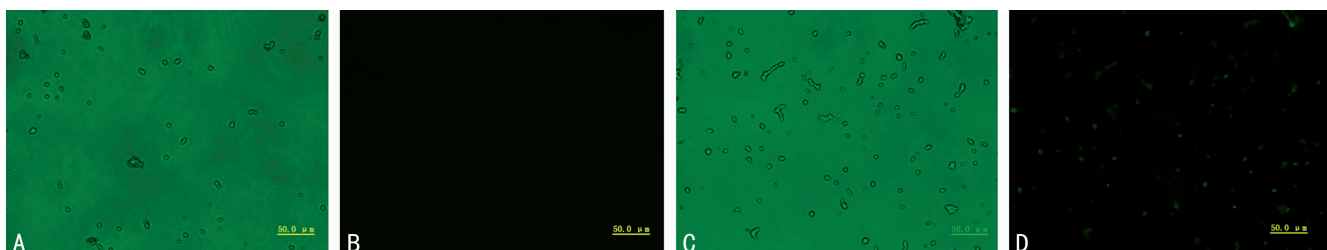
图 2 LysAB3-D 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

2.3 扫描电子显微镜下观察 AB 菌体形态 经 LysAB3 处理后的 AB 菌体表面粗糙、皱缩、肿胀、碎片形成, 原有形态改变(图 3A); 而 LysAB3-D 处理后及对照组的 AB 菌体表面光滑、形态规则, 呈杆状(图 3B、C)。表明 LysAB3 对 AB 有裂解活性, 而删除了两性多肽结构的 LysAB3-D 则丧失了抗菌作用, 提示这种两性多肽结构在抗菌过程中可能起到重要作用。



A: LysAB3 处理后; B: LysAB3-D 处理后; C: 阴性对照。

图 3 扫描电子显微镜下 AB 菌体形态(×10 000)



A: LysAB3-D 处理后普通白光显微镜; B: LysAB3-D 处理后荧光显微镜; C: LysAB3 处理后普通白光显微镜; D: LysAB3 处理后荧光显微镜。

图 4 荧光显微镜下细菌细胞外膜通透性的改变(×400)

2.4 荧光显微镜下观察 AB 外膜通透性 FITC 是一种小分子量(389.4 Da)绿色荧光探针,不能通过细菌细胞膜。本研究发现,FITC 不能进入 LysAB3-D(删除两性多肽结构)处理过的 AB 菌体,荧光显微镜不能在菌体中发现绿色荧光的聚集(图 4A、B);但 FITC 却能进入 LysAB3 处理过的 AB 菌体,通过荧光显微镜可见绿色荧光在菌体内的聚集(图 4C、D)。提示裂解酶 LysAB3 的两性多肽结构可增加细菌外膜通透性,有助于 FITC 进入其中^[8]。

3 讨论

噬菌体治疗细菌感染时需要与宿主菌发生特异性吸附并注入其 DNA,导致噬菌体抗菌谱的专一性太强,大大限制了噬菌体的应用^[2]。而裂解酶是噬菌体基因组复制晚期合成的一种酶,它能降解细菌细胞壁的肽聚糖结构,从而裂解细菌菌体,是一种新型杀菌物质。虽然裂解酶应用于革兰阳性菌治疗方面的研究较多,但应用于革兰阴性菌感染方面的研究却很少。其原因为革兰阴性菌外膜的主要成分——脂多糖不允许大分子量物质通过,仅允许小分子量疏水性物质通过。

而噬菌体 AB3 来源的裂解酶 LysAB3 C 端(113~145 aa)聚集的氨基酸往往带有较多正电荷,如赖氨酸、精氨酸,周围还被疏水氨基酸所包绕,构成了包含碱性氨基酸残基的螺旋状两性多肽结构。借助这种螺旋状两性多肽结构,LysAB3 的 C 端可明显增加革兰阴性菌外膜的通透性。究其原因可能与细菌外膜形成离子孔道有关,LysAB3 的 C 端可竞争性地替代革兰阴性菌外膜中,发挥连接作用的 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} ,并中和脂多糖,破坏了细菌外膜的密闭性,增加了通透性^[3]。LysAB3 通过细菌外膜进入菌体后,可水解细胞壁肽聚糖共价键,破坏菌体的完整性、裂解细菌,达到抗菌治疗目的。有研究指出,缺少 C 端的 T4 裂解酶,不能通过细菌外膜,提示裂解酶 C 端的两性多肽结构可能在增加细菌外膜通透性方面起到重要作用^[9-10]。Lai 等^[3]构建的裂解酶缺少两性多肽结构,仅保留了酶催化区域,使裂解酶丧失了对细菌外膜的通透性,抗菌率下降至原水平的 40%;若进一步去除酶催化区域,抗菌率可进一步下降至原水平的 20%,提示两性多肽结构在裂解酶杀菌过程中起到了重要作用。

本研究发现经 LysAB3 处理后的 AB₃ 菌体部分裂解为碎片,残存菌体表面粗糙、皱缩、肿胀,原有形态改变,而删除两性多肽结构的 LysAB3-D 处理后的 AB 却未见上述现象。另一方面,经 LysAB3 处理后的 AB 外膜通透性增加,导致原本不能通过细胞膜的 FITC 进入其中,菌体内可见绿色荧光的聚集。而删除两性多肽结构的 LysAB3-D 处理后的 AB 菌体中却未见有绿色荧光的聚集,提示裂解酶的两性多肽结构增加了细菌外膜通透性,削弱了菌体的密封性,不仅导致裂解酶进入其中降解肽聚糖,还可导致菌体内重要物质如 DNA 的丢失、渗透压的改变,最终导致细菌的裂解。下一步的研究将重组和表达这种两性多肽结构的蛋白质,如果将其与抗菌药物联用,可成为一种“helper agent”^[11],来增加细菌外膜的通透性,有利于抗菌药物进入其中发挥作用,提高抗菌药物的杀菌能力。甚至还可找到一个两性多肽结构蛋白使用的恰当浓度,既可增加细菌外膜通透性,又不会彻底破坏细菌外膜的完整性,从而减少菌体裂解所导致的内毒素释放,而这正是裂解酶应用于抗菌治疗中所存在的最大问题^[12]。

裂解酶 LysAB3 通过其 C 端的两性多肽结构来增加 AB

外膜的通透性,辅助具有酶解催化域的 N 端降解肽聚糖共价键,导致细菌裂解,达到抗菌目的^[13]。在下一步的研究中,可通过重组和表达这种两性多肽结构蛋白来增加细菌外膜的通透性,从而提高抗菌药物的效力,减少耐药率的发生^[14-15]。

参考文献

- [1] Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. An increasing threat in hospitals; multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(12): 939-951.
- [2] Popova AV, Zhilenkov EL, Myakinina VP, et al. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 332(1): 40-46.
- [3] Lai MJ, Lin NT, Hu A, et al. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(2): 529-539.
- [4] Lin NT, Chiou PY, Chang KC, et al. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Res Microbiol*, 2010, 161(4): 308-314.
- [5] Mangoni ML, Papo N, Barra D, et al. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli* [J]. *Biochem J*, 2004, 380(Pt3): 859-865.
- [6] Huang G, Le S, Peng Y, et al. Characterization and genome sequencing of phage Abp1, a new phiKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Curr Microbiol*, 2013, 66(6): 535-543.
- [7] Li P, Chen B, Song Z, et al. Bioinformatic analysis of the *Acinetobacter baumannii* phage AB1 genome [J]. *Gene*, 2012, 507(2): 125-134.
- [8] Yele AB, Thawal ND, Sahu PK, et al. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm [J]. *Arch Virol*, 2012, 157(8): 1441-1450.
- [9] Orito Y, Morita M, Hori K, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(1): 105-109.
- [10] Morita M, Tanji Y, Orito Y, et al. Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria [J]. *FEBS Letters*, 2001, 500(1/2): 56-59.
- [11] Kang SJ, Park SJ, Mishig-Ochir T, et al. Antimicrobial peptides; therapeutic potentials [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014, 12(12): 1477-1486.
- [12] Chen L, Zhu Y, Yang D, et al. Synthesis and antibacterial activities of antibacterial peptides with a spiropyran fluorescence probe [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6860.
- [13] Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial(下转第 1167 页)

抑癌基因多数作用聚集在细胞周期的调控机制上,通过直接参与肝细胞的周期调控^[8],促使肝细胞呈现失控性增殖,最终导致肿瘤的发生。

P16 蛋白能通过抑制 CDK4 的活性使细胞分裂停滞于 G₁/S 期阻止细胞的异常增生,是一种重要的抑癌基因,大量研究显示在肝细胞癌组织中 P16 基因常出现表达缺失或异常,进展期肝细胞癌组织中其异常率高达 60%,被认为是致病机制中的重要环节^[9]。P57 位于染色体 11p15.1,该区域的缺失常与肿瘤相关。研究显示 P57 在前列腺癌、膀胱癌及胰腺癌等恶性肿瘤中表达降低^[10-12]。P57 基因敲除小鼠出现增长过度,呈现高频率的肿瘤转向,研究主要认为其通过抑制细胞周期来实现抑制肿瘤发生^[13]。有研究显示 P57 在细胞核中能通过抑制 cyclinD1 及 CDK2 的表达,降低 CDK4/cyclinD1 及 CDK2/cyclinE 的活性抑制肿瘤细胞的增殖^[14]。Ki67 被广泛用于反映癌症及肺癌细胞的增殖活性^[15-16]。为了研究 P57^{kip2}、Ki67 及 P16^{INK4} 在肝癌发生、发展过程中的作用,本研究通过免疫组织化学染色和 Western blot 法分析其在肝癌组织、对应的癌旁组织及正常肝组织中的表达水平,结果显示 p57kip2 蛋白在肝癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织及正常肝组织, Ki67 蛋白在肝癌组织中呈现高表达, P16^{INK4} 在肝癌组织中表达显著降低,差异有统计学意义,提示 P16^{INK4} 及 P57^{kip2} 表达可能降低参与细胞周期 G₁/S 调控,促使正常肝细胞的增殖发生紊乱,增长过度,导致肿瘤的发生,在此过程中作为肿瘤细胞增殖的指标之一, Ki67 的表达显著增加。根据 Edmondson 分级,高分化组中 P57^{kip2}、P16^{INK4} 呈现低表达, Ki67 表达较低分化组增加,提示 P57^{kip2}、P16^{INK4} 及 Ki67 在肝癌的发展过程中可能有重要的作用。

P16^{INK4}、P57^{kip2} 表达降低及 Ki67 的高表达在肝细胞癌的发生、发展过程中可能有着重要的作用, P16^{INK4}、P57^{kip2} 参与的细胞周期 G₁/S 期转化异常,可能是肝癌发生的机制之一,三者联合检测可能对于肝细胞癌的诊断有重要的价值。

参考文献

- [1] Elkalawy MA, Maxwell P. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumour stage and patient survival[J]. J Pathol, 2001, 194(4):436-443.
- [2] Naqshe Zahra S, Khattak NA, Mir A. Comparative modeling and docking studies of p16ink4/cyclin D1/Rb pathway genes in lung cancer revealed functionally interactive residue of RB1 and its functional partner E2F1[J]. Theor Biol Med Model, 2013, 10:1.
- [3] 罗祖强,周正平,格桑志玛,等. 子宫内膜癌及不同子宫内
(上接第 1164 页)
agents[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2006, 231(4):366-377.
- [4] Coulter LB, McLean RJ, Rohde RE, et al. Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa biofilms [J]. Viruses, 2014, 6(10):3778-3786.
- [5] 膜病变组织中 p57kip2、ER、PR 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(9):982-985.
- [4] Raghunandhakumar S, Paramasivam A. Thymoquinone inhibits cell proliferation through regulation of G₁/S phase cell cycle transition in N-nitrosodiethylamine-induced experimental rat hepatocellular carcinoma[J]. Toxicol Lett, 2013, 223(1):60-72.
- [5] 庄利萍,于璐,杨倩,等. 肝癌组织晚期糖基化终产物受体的表达及其与病理因素的关系[J]. 广东医学, 2013, 34(8):1205-1207.
- [6] Wang B, Ding YM. Expression and significance of MMP2 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2014, 8(2):539-546.
- [7] 李巍,叶研硕,刘宏宇,等. 调节性 T 细胞在肝癌发生、发展中的作用及机理[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(12):2223-2226.
- [8] 李明,薛慧琴,朱镭,等. 细胞周期检测点激酶 1 在原发性肝癌中的表达及其与肝癌的相关性[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(4):502.
- [9] Dickson MA. Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(13):3379-3383.
- [10] 孙凯,曾俊杰,王伟,等. 微小 RNA-221 对结直肠癌中 CDKN1C/P57 表达调控的研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2011, 14(4):279-283.
- [11] 易晓佳,申丽娟,章宗籍,等. 人肝癌 P57~(kip2) 基因失表达的遗传不稳定性[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(3):272-274.
- [12] 赵亚男,孙冬霞,王蕾,等. 三阴乳腺癌组织中 p57 和 ki67 的表达意义及相关性研究[J]. 西部医学, 2013, 25(5):654-656.
- [13] Jin RJ, Lho Y. Down-regulation of p57Kip2 induces prostate cancer in the mouse[J]. Cancer Res, 2008, 68(10):3601-3608.
- [14] 林荣志. Cyclin D1、CDK4、p57<'KIP2> 在喉鳞状细胞癌中的表达和意义[D]. 福州:福建医科大学, 2010.
- [15] 王宝娜,王翔,王靖,等. Ki67 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(4):273-275.
- [16] 曾祥,李岩,裴冬梅,等. DOG1、CD117 和 Ki67 在胃肠道间质瘤中的表达及其与临床病理因素和危险度的相关性[J]. 中国医科大学学报, 2014, 43(5):449-453.

(收稿日期:2014-10-31 修回日期:2014-12-22)

(收稿日期:2014-10-09 修回日期:2014-12-03)

- [15] Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their Enzymes in Biofilm Control[J]. Curr Pharm Des, 2014, 21(1):85-99.