

· 论 著 ·

iASPP 真核表达载体构建及其功能鉴定*

陈 杰¹, 杨益民¹, 杨靓靓¹, 杨 婷¹, 蔡 云², 辛海明², 刘泽军^{2△}

(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 Jie¹, Yang Yimin¹, Yang Liangliang¹, Yang Ting¹, Cai Yun², Xin Haiming², Liu Zejun^{2△}

(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^[1]。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^[2], 现已在多种肿瘤细胞中发现 iASPP 过高表达的现象^[3-7], 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^[8]。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^[9], 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-myristate-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研究工作。 △ 通讯作者, Tel: (023)68765945; E-mail: zezunliu@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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵箱内培养 2 h。制备下列溶液,溶液 A:分别取含 10 μ 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 μ 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% CO₂、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 μ g/mL 和 50 ng/mL 后,置培养瓶于 5% CO₂、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 μ g 的 pcDNA3.1(+)-iASPP 和 2 μ g 的 pGCsi_H1/Neo/GFP 空白质粒,转染步骤同上。

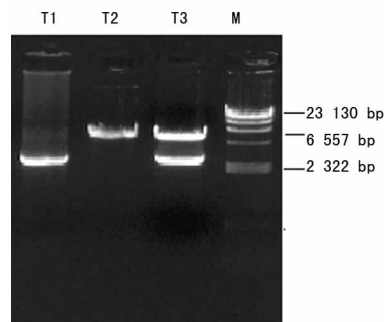
1.3.4 RT-PCR 法检测转染后细胞中 iASPP 基因 mRNA 表达水平 根据 Tripure 操作说明提取待测细胞总 RNA,然后按 RT-PCR 操作方法进行 mRNA 检测。RT-PCR 扩增人 iASPP 基因家族与 β -actin 的 cDNA 序列引物设计:根据 GenBank 中提供的 iASPP(AJ888472)和 β -actin(BC14861)的编码氨基酸的 cDNA 序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物,所有引物均由上海申工生物有限公司合成。iASPP 基因 PCR 扩增参数:95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ 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; β -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'。 β -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 μ L 结合缓冲液重新悬浮细胞,并使其浓度为 1×10^6 /mL。取 100 μ L 细胞悬液于 1.5 mL EP 管中,分别加入 5 μ L 膜联蛋白 V-早硫氰酸荧光素(Annexin V/FITC)和 10 μ 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 μ 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。

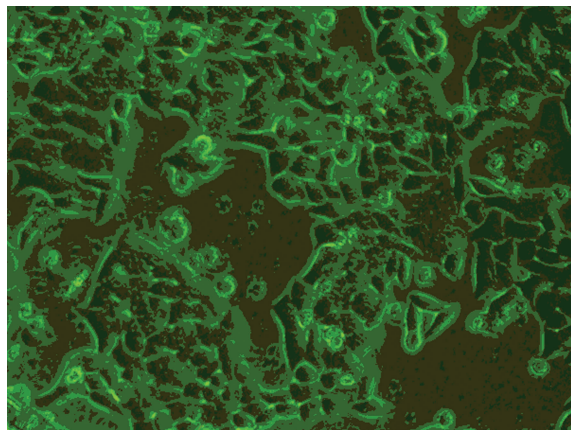
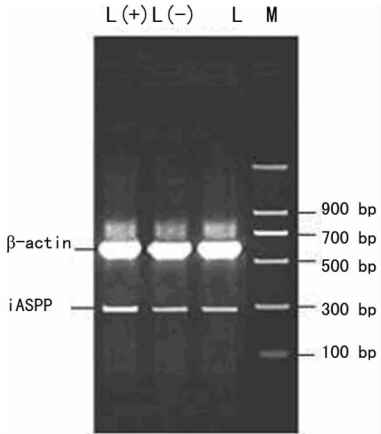


图 2 质粒共转染 Lovo 细胞后荧光显微镜观察($\times 200$)

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

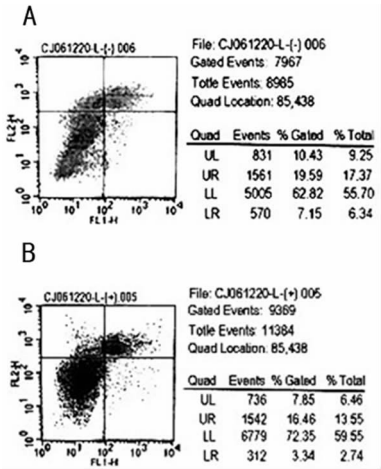
细胞株 iASPP 基因 mRNA 水平分别升高了 49.1%和 94.4%，未转染质粒和转染了空质粒之间差别不大。Lovo 细胞转染各种质粒后 iASPP mRNA 的表达鉴定图,见图 3。



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^[10],Liu 等^[4],Cai 等^[10]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^[2]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 iAPPS 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^[11-12]。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^[13-14]。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)

3 讨 论

RA 是一种慢性进行的对称糜烂性滑膜炎为特征的自身免疫性疾病,有时出现多系统受累^[6]。ESR、CRP 为常用的 RA 实验室指标。本 Meta 分析他汀类药物对 ESR、CRP 的影响,结果显示他汀类药物对 CRP 有明显改善 $[\bar{x}-0.58s, 95\%CI: (-1.08, -0.09), \text{随机模型}]$,而对 ESR 无改善 $[\bar{x}-3.62s, 95\%CI: (-12.15, 4.92), \text{随机模型}]$ 。心血管事件是引起 RA 患者死亡的主要原因,患有 RA 的患者与普通人群相比,其心血管疾病的患病率及病死率大大增加^[13-14],CRP 浓度增高可能是直接导致动脉粥样硬化的机制。白细胞介素 6(IL-6)在急性反应期的主要功效是刺激肝细胞产生急性期反应蛋白,其中主要是 CRP;CRP 通过促进单核细胞向血管壁黏附,促进平滑肌细胞迁移和增生,通过激活内皮细胞核因子 κB (NF- κB) 等机制,从而促进动脉粥样硬化的形成与发展。体外实验证明,他汀类药物可以通过抑制 IL-6 的合成,从而降低 CRP 的水平^[15]。

本研究也存在一些潜在的局限性。一是由于几个搜索出的研究未能提供可用的 ESR、CRP 水平变化数据,因此不能用于本 Meta 分析^[3-5,9-10]。二是所有研究的样本量小,导致其出现假阳性结果机会较高。最后,本 Meta 分析研究的数目相对较小,漏斗图汇集估计不能执行,有可能发生偏倚。

总之,本 Meta 分析得出他汀类药物在治疗 RA 中对 CRP 水平有改善,而对 ESR 无改善,尽管本研究有一定的局限性但是结果表明他汀类药物治疗 RA 对减少炎症水平有一定的作用。

参考文献:

[1] Libby P,Ridker PM,Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. *Circulation*,2002,105(9):1135-1143.

[2] Kwak B,Mulhaupt F,Myit S,et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator[J]. *Nat Med*,2000,6(12):1399-1402.

[3] Kjaergard LL,Villumsen J,Gluud C. Reported methodologic quality and discrepancies between large and small randomized trials in meta-analyses[J]. *Ann Intern Med*,2001,135(11):982-989.

[4] Nikitina NM,Rebrov AP. The use of atorvastatin in patients with rheumatoid arthritis with hyperlipidemia[J]. *Kardiologiia*,2009,49(9):21-26.

[5] Tutunov VS,Popkova TV,Novikova DS,et al. Comparative assessment of antiinflammatory action of atorvastatin in ischemic heart disease and rheumatoid arthritis[J]. *Kardiologiia*,2008,48(9):4-8.

[6] El-Barbary AM,Hussein MS,Rageh EM,et al. Effect of

atorvastatin on inflammation and modification of vascular risk factors in rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*,2011,38(2):229-235.

[7] Goto M. A comparative study of anti-inflammatory and anti-dyslipidemic effects of fenofibrate and statins on rheumatoid arthritis[J]. *Mod Rheumatol*,2010,20(3):238-243.

[8] Mäki-Petäjä KM,Booth AD,Hall FC,et al. Ezetimibe and simvastatin reduce inflammation,disease activity,and aortic stiffness and improve endothelial function in rheumatoid arthritis[J]. *J Am Coll Cardiol*,2007,50(9):852-858.

[9] McCarey DW,McInnes IB,Madhok R,et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis(TARA):double-blind,randomised placebo-controlled trial[J]. *Lancet*,2004,363(9426):2015-2021.

[10] Hermann F,Forster A,Chenevard R,Enseleit F,et al. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis[J]. *J Am Coll Cardiol*,2005,45(3):461-464.

[11] Tikiz C,Utut O,Pirildar T,et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and statin treatment on inflammatory markers and endothelial functions in patients with longterm rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*,2005,32(11):2095-2101.

[12] Charles-Schoeman C,Khanna D,Furst DE,et al. Effects of high-dose atorvastatin on antiinflammatory properties of high density lipoprotein in patients with rheumatoid arthritis;a pilot study[J]. *J Rheumatol*,2007,34(7):1459-1464.

[13] del Rincón I,Williams K,Stern MP,et al. High incidence of cardio vascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors[J]. *Arthritis Rheum*,2001,44(12):2737-2745.

[14] Goodson NJ,Wiles NJ,Lunt M,et al. Mortality in early inflammatory polyarthritis;cardiovascular mortality is increased in seropositive patients[J]. *Arthritis Rheum*,2002,46(8):2010-2019.

[15] Arnaud C,Burger F,Steffens S,et al. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes:new evidence for direct anti-inflammatory effects of statins[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2005,25(6):1231-1236.

(收稿日期:2013-09-17 修回日期:2013-10-31)

(上接第 4243 页)

[11] 季晓鹏,王志红. 我国城市家庭护理服务模式的现状与分析[J]. *解放军护理杂志*,2007,24(9B):33-34.

[12] Hamada S,Benhia H,Benzekri L,et al. Kissing lesions heralding vegetative tuberculosis[J]. *Ann Dermatol Venerol*,2013,140(1):67-68.

[13] Ukwaja KN,Alobu I,Nweke CO,et al. Healthcare-seeking behavior,treatment delays and its determinants among pulmonary tuberculosis patients in rural Nigeria:a

cross-sectional study[J]. *BMC Health Serv Res*,2013(13):25.

[14] Saadi H,Mamouni N,Errarhay S,et al. Pseudo tumor pelvic-perineal tuberculosis;report of four cases[J]. *Pan Afr Med J*,2012(13):52.

[15] El B R,Lahkim M,Achour A. Abdominal pseudotumoral tuberculosis[J]. *Pan Afr Med J*,2012(13):32.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-26)