

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.019

EDA-A1 基因突变体对人脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖及细胞周期的影响

雷科¹, 王伦昌^{1△}, 李龙江², 车团结³, 何祥一⁴

(1. 四川省广元市中心医院口腔科 628000; 4. 四川大学口腔疾病重点研究实验室, 成都 610000;

3. 兰州大学生命科学院细胞生物学研究所, 兰州 730000; 4. 兰州大学口腔医学院口腔修复科, 兰州 730000)

摘要:目的 研究少汗型外胚层发育不良症 EDA-A1 基因突变体对人脐静脉内皮细胞(ECV)周期和增殖活性的影响。方法 构建 EDA-A1 基因编码序列(CDS)突变体和野生型的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-EDA-A1-M/W, 转染人脐静脉内皮细胞, 逆转录 PCR(RT-PCR)扩增 EDA-A1 基因, 蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测 EDA-A1 蛋白表达, MTT 法、流式细胞术检测 EDA-A1 基因突变体对 ECV 细胞增殖和细胞周期的影响。结果 RT-PCR、Western blot 结果显示, 野生型组和突变体组 ECV 细胞表达 EDA-A1 基因及其蛋白, 而空质粒转染组[pcDNA3.1(-)]和空白对照组细胞无表达。与对照组(空质粒组)相比, 突变体组 ECV 细胞增殖活性下降, 生长抑制率为 45.70% ($P < 0.01$), 野生型细胞增殖活性无明显改变 ($P > 0.05$)。突变体组中有更多细胞进入 G₀/G₁ 期、S 期; 野生型组 S 期细胞增多, G₂/M 期细胞明显减少 ($P < 0.05$)。结论 突变体和野生型 EDA-A1 基因对 ECV 细胞增殖和细胞周期有不同的生物学功能。

关键词: 细胞周期; 细胞增殖; EDA-A1 基因; 突变体; 人脐静脉内皮细胞

中图分类号: R781.6

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)31-4175-04

Effect of EDA-A1 gene mutant on proliferation and cell cycle distribution of cultured human umbilical vein endothelial cell ECV304

Lei Ke¹, Wang Lunchang^{1△}, Li Longjiang², Che Tuanjie³, He Xiangyi⁴

(1. Department of Stomatology, Central Hospital of Guangyuan, Guangyuan, Sichuan 628000, China;

2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610000, China;

3. Institute of Cell Biology, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China;

4. Department of Prosthodontics, School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ectodysplasin A (EDA-A1) gene of hypohidrotic ectodermal dysplasia on proliferation and cell cycle of human umbilical vein endothelial cell (ECV304). **Methods** Recombinant eukaryotic expression vectors pcDNA3.1(-)-EDA-A1-M/W (mutant, M and wild, W) containing the coding sequence were transected into ECV304 cells. EDA-A1 gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the protein was detected by Western blot. Cell viability and cycle distribution were investigated by MTT and Flow cytometry (FCM). **Results** The EDA-A1 gene and protein were detected respectively by RT-PCR and Western blot in ECV cells transfected with pcDNA3.1(-)-EDA-A1-M/W, but not in ECV cells transfected with plasmid pcDNA3.1(-) and cells without transection. And also, compared with control groups, EDA-A1 gene mutant significantly decreased proliferation of ECV cells and its inhibition rate was 45.70% ($P < 0.01$), whereas wild EDA-A1 gene did not cause such growth inhibition ($P > 0.05$). A significant increase of the G₀/G₁ and S fraction was seen in the ECV cells of mutant group, compared with wild group with an accumulation in S phase and a concomitant decrease in G₂/M phase population ($P < 0.05$). **Conclusion** Mutant and wild EDA-A1 gene may have distinct biological functions on proliferation and cell cycle distribution of cultured human umbilical vein endothelial cell.

Key words: cell cycle; cell proliferation; EDA-A1 gene; mutant; human umbilical vein endothelial cell

临床上先天多个或者全部牙齿缺失的病例以少汗型外胚层发育不良症(hypohidrotic ectodermal dysplasia, HED, OMIM305100)、Axenfeld-Rieger 综合征(OMIM180500)、Hallermann-Streiff 综合征(OMIM234100)最为常见^[1]。HED 又称为无汗型外胚层发育不良症(anhidrotic ectodermal dysplasia, AED)或 Christ-Siemens-Touraine 综合征, 是一种罕见的先天性遗传性疾病, 出生发病率约为 1/100 000~1/10 000, 以 XLHED 最为常见^[2]。受累患者通常具有以下临床体征: 毛发稀少、汗腺发育不全、颅面异常、前额突出、鼻梁塌陷(鞍状鼻)、皮肤光滑干燥、手指(脚趾)过度角化、中耳炎等; 口腔表征可为缺牙症、多数牙先天缺失、以及锥形牙等^[3-6]。该病 95%

为 X 连锁隐性遗传疾病(X-linked HED, XLHED), XLHED 由 Xq12-13.1 的 EDA 基因变异引起^[2-3]。EDA 基因编码一种新的肿瘤坏死因子(TNF)配体家族蛋白 EDA, 与核因子- κ B(NF- κ B)信号传导机制有关^[4-5]。Bayés 等^[7]发现了 EDA 基因的全长序列, 共 5 296 bp, 开放性读码框(open reading form, ORF)共 1 176 bp, 编码 391 氨基酸的蛋白(EDA-A1, Gene ID1896)。本课题组通过对 XLHED 家系进行临床和分子生物学检测, 发现 EDA-A1 基因 907 位 A→C(A907C)错义突变, 导致 306 位编码氨基酸由谷氨酰胺变为脯氨酸(Gln306Pro); 并构建 EDA-A1 基因突变体[pcDNA3.1(-)-EDA-A1-M]和野生型[pcDNA3.1(-)-EDA-A1-W]真核表达

载体^[8]。本实验通过检测转染 *EDA-A1* 基因及其突变体的人脐静脉内皮细胞增殖活性、细胞周期和蛋白表达,为进一步研究该基因在牙齿发育中的生物学功能、探讨 *EDA* 蛋白在 NF- κ B 信号传导通路中的作用奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞株 ECV304(由兰州大学生命科学院王春明老师惠赠);*EDA-A1* 基因突变体[pcDNA3.1(-)-*EDA-A1-M*]和野生型[pcDNA3.1(-)-*EDA-A1-W*]真核表达质粒(由本实验室构建);新生牛血清(杭州四季青);干粉型 RPMI-1640(华美公司);抗兔/鼠二抗(Sigma 公司);Effectene Transfection Reagent 试剂盒(QIAGEN 公司);逆转录(RT)试剂盒及 PCR 反应相关试剂(Fermentas 公司);NC 膜(RPN303E, Amersham 公司);内参 β -actin(Bioworld 公司)。

1.2 主要仪器 Coulter Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);SpectraMax 190 酶标仪(美国 Moteular Devices 公司);Chemilmager 5500 凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司);MyGeneTM Series Peltier Thermal LongGene Scientific Cyler Model MG96 + TGL-13 Microcentrifuge Instruments Co. Ltd.。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 ECV304 细胞株,于含 10% 新生小牛血清、100 U/mL 青链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养,37 °C、5% CO₂ 孵箱中内贴壁生长,用 0.25% 胰酶消化传代。倒置显微镜观察细胞形态。

1.3.2 质粒阳性克隆的抽提 参照卢圣栋的方法提取^[9]。取大提的质粒 DNA 3 μ L,无菌去离子水稀释至 1 mL,紫外分光光度计测吸光度(A)_{260 nm} 以及 A_{280 nm} 的值,计算提到的质粒 DNA 的量。质粒 DNA 的浓度(μ g/ μ L) = A₂₆₀ \times 稀释倍数 \times 50/1 000,得到的质粒 DNA(阳性重组体和空载)用乙醇沉淀,超净台晾干沉淀,将 DNA 沉淀重悬于无菌去离子水中。

1.3.3 细胞转染 按照 QIAGEN-Effectene Transfection Reagent 试剂盒说明转染。细胞在转染前 24 h 传代,待细胞密度达 70% 进行转染。转染前 2 h 换完全培养基。分别将 2.5 μ g 突变体、野生型质粒 DNA 缓慢滴加到 2 mol/L CaCl₂ 中,静置 10 min。然后将 DNA-CaCl₂ 溶液再缓慢地滴加到 2 \times HeBS 中,室温静置 30 min,出现细小颗粒沉淀。将沉淀逐滴均匀地加入培养瓶中,轻轻晃动。标准条件下生长 12 h,除去培养液,用 HeBS 液洗细胞 2 次,加入完全培养液培养细胞。同时设置空质粒转染组细胞作为对照组。

1.3.4 RT-PCR 检测 *EDA-A1* 基因 mRNA 表达水平 各组细胞转染后培养 48 h,按照 RT 试剂盒说明提取总 RNA。紫外分光光度计测 A_{260 nm} 以及 A_{280 nm} 的值,计算总 RNA 浓度,琼脂凝胶电泳分析总 RNA 的质量。*EDA-A1* 基因引物用软件 Primer Premier 5.0 设计,上海生物工程公司合成。(1) *EDA-A1* 基因 mRNA 上游引物为:5'-CGC AGG ATC CAT GGG CTA CCC GGA GGT-3';(2) *EDA-A1* 基因 mRNA 下游引物为:5'-ATT AAG CTT GCC AAG CGG GCA CCA GGG AGA C-3';*EDA-A1* 基因扩增产物为 408 bp;(3) β -actin mRNA 作为内参照,上游引物为:5'-ACG CAT TTG GTC GTA TTG GG-3';下游引物为 5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3';扩增产物 230 bp。RT-PCR 反应体系参照文献^[8]。取 PCR 扩增产物 5 μ L 120 V、90 mA 条件下在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,反应产物 4 °C 保存备用。

1.3.5 Western blot 检测 *EDA-A1* 蛋白的表达 将细胞裂解,收集蛋白,Bradford 法测定蛋白质含量。制备的全菌蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后转移到 0.45 μ m 孔径硝酸纤维素(NC)滤膜(RPN303E, Amersham),用含 0.5% Tween 和 5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液 37 °C 封闭 1 h, TBST[0.1 mol/L Tris-buffered saline (pH 7.6) with 0.1% Tween]洗涤 3 次;将 NC 膜在 1:200 倍稀释血清的 TBST(含 2% 脱脂奶粉)溶液中,37 °C 作用 1 h,同上洗涤 3 次;然后再将 NC 膜在 1:2 000 倍稀释酶标抗兔/鼠二抗的 TBST(含 2% 脱脂奶粉)溶液中,37 °C 条件作用 1 h,同上洗涤 3 次;加入底物显色并终止反应。

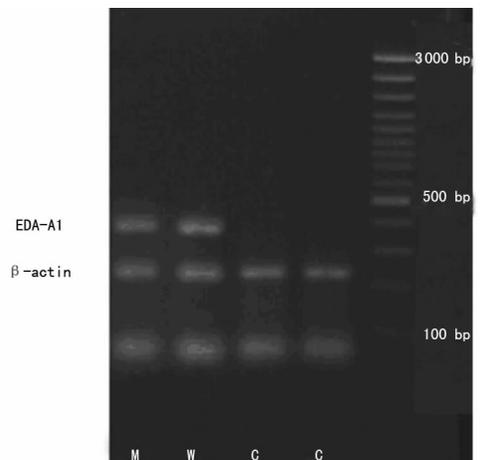
1.3.6 MTT 法检测细胞增殖能力 取对数期生长的细胞,胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔细胞数为 5 000 个。12 h 后吸弃原培养液,每孔加入 100 μ L 无血清 DMEM。72 h 后每孔加入 20 μ L MTT,37 °C 孵育 4 h 后,弃上清用 DMSO 溶解沉淀,测其波长在 560 nm 处 A 值,记录结果。根据实验测得的 A 值计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率(%) = (1 - 实验组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。每组设 10 个平行。

1.3.7 流式细胞仪检测细胞周期 收集转染后 48 h 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化细胞呈悬浮液,离心(1 200 r/min,5 min)后弃上清液,将细胞悬浮于 PBS 中。用冷 PBS 洗 2 次,70% 的冷乙醇固定过夜。固定后离心细胞(1 200 r/min,5 min),弃固定液,PBS 洗涤 3 次,调整细胞浓度为 1 \times 10⁶ 个/mL,与含有 1% RNase 的 Tris-HCL 缓冲液(pH 7.4)共同孵育 10 min,PI 染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期变化。Cell Quest 软件分析 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期细胞百分数,每组实验均设 5 个平行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 *EDA-A1* 基因转染对 ECV 细胞 mRNA 表达的影响 RNA 样品 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值均在 1.8~2.0 之间,可以用来做 RT-PCR。转染突变体和野生型 *EDA-A1* 基因组在 408 bp 和 230 bp 各出现 1 条带,而对照组细胞只出现了内参的条带,大小为 230 bp,见图 1。

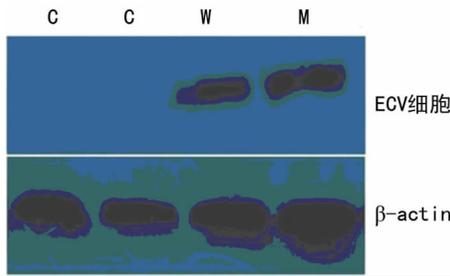


M:突变体;W:野生型;C:对照组。

图 1 RT-PCT 检测 ECV 细胞中基因 mRNA 表达

2.2 转染后 ECV 细胞 *EDA-A1* 蛋白的表达 Western blot 结果表明,*EDA-A1* 蛋白条带仅出现在 *EDA-A1* 基因转染组,

而对对照组无蛋白表达,见图 2。



C:空白对照组;W:野生型组;M:突变体组。

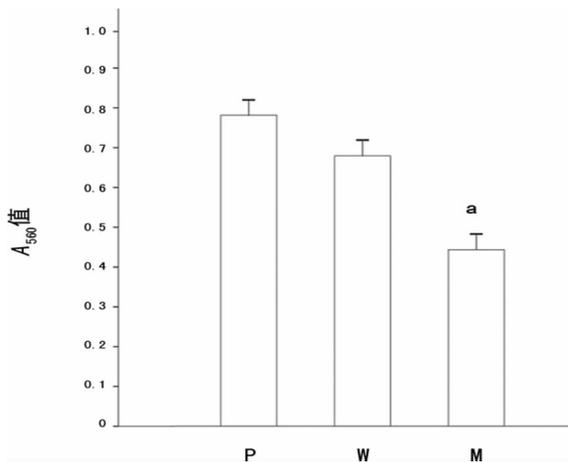
图 2 转染 EDA-A1 基因后 ECV 细胞蛋白的表达

2.3 EDA-A1 基因对 ECV 细胞增殖的影响 对 EDA-A1 基因转染后 96 h 的 ECV 细胞进行 MTT 检测。与对照组相比,突变体组细胞增殖明显下降,生长受到抑制,细胞增殖活性在转染后 96 h A_{560} 仅为对照组的 54.30%。突变型 EDA-A1 基因组 ECV 细胞生长抑制率为 45.70% ($P < 0.01$),野生型 EDA-A1 基因组 ECV 细胞增殖活性无明显改变 ($P > 0.05$),见表 1、图 3。

表 1 EDA-A1 基因转染 ECV 细胞 96 h 后的 A_{560} 值($\bar{x} \pm s$)

组别	A_{560} 值	抑制率(%)
对照组	0.790 ± 0.037	2.5
野生型组	0.680 ± 0.016	16.0
突变型组	0.440 ± 0.033 ^a	45.7 ^a

^a: $P < 0.01$,与对照组比较。



M:突变体;W:野生型;C:空白对照组。^a: $P < 0.01$,与对照组比较。

图 3 EDA-A1 基因转染 ECV 细胞 96 h 后的 A_{560} 值

表 2 EDA-A1 基因对 ECV 细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照组	20.30 ± 0.68	8.55 ± 0.57	71.15 ± 0.57
野生型组	20.37 ± 0.68	14.80 ± 1.45 ^a	64.83 ± 0.85 ^a
突变体组	25.45 ± 1.89 ^{ab}	12.40 ± 1.75 ^a	62.15 ± 1.94 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与野生型组比较。

2.4 EDA-A1 基因对 ECV 细胞周期的影响 采用流式细胞仪(FCM)的方法检测 EDA-A1 基因转染后 ECV 细胞处于不同细胞周期的比例变化(图 4)。与对照组相比,野生型组 S 期

细胞增多,G₂/M 期细胞明显减少($P < 0.05$),G₀/G₁ 期细胞比例变化不大;突变体组中有更多细胞进入 G₀/G₁ 期、S 期,而 G₂/M 期细胞明显减少($P < 0.05$);与野生型组相比,突变体组中 G₀/G₁ 期细胞比例增加,S 期、G₂/M 期细胞差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

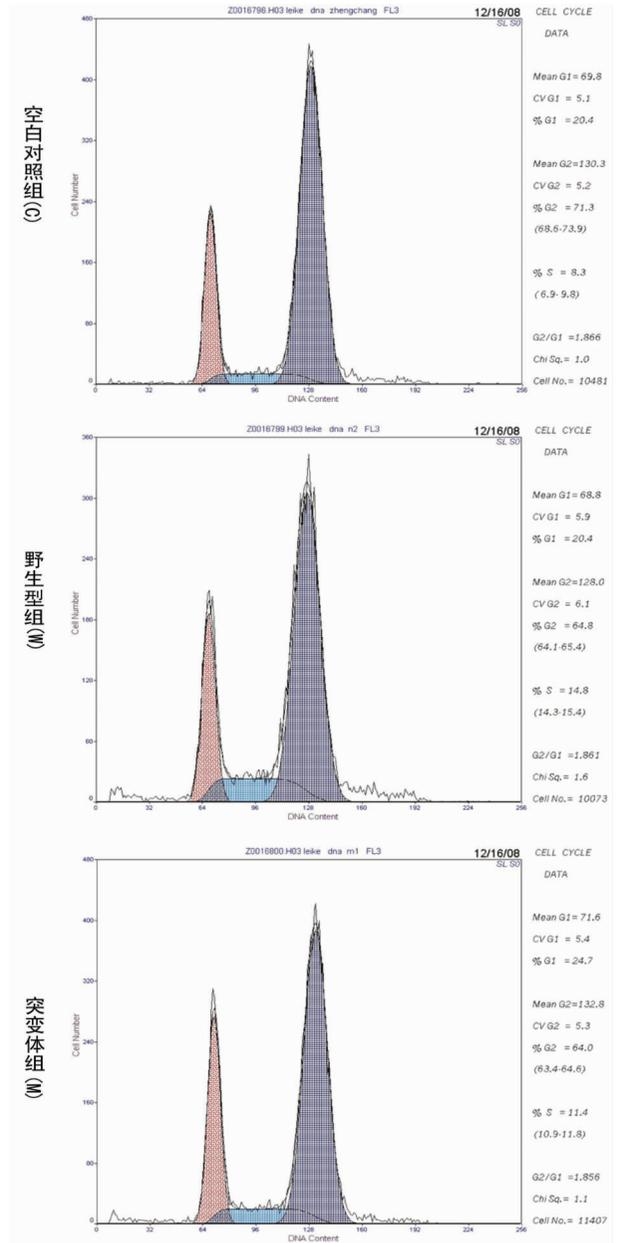


图 4 EDA-A1 基因突变体对 ECV 细胞周期的影响

3 讨 论

HED 主要有 4 种遗传类型:(1)XLHED(MIM305100),由 Xq12-13.1 的 EDA 基因(Gene ID1896)变异引起,是 200 多种外胚层发育不全中最为常见者^[5,10-11];(2)X 连锁隐性伴免疫缺陷(HED-ID)(MIM300291),基因突变定位于 Xq28 的 NEMO 基因(Gene ID 51701),其编码的 NF- κ B 家族细胞信号转移因子,在免疫、炎症反应、组织发生、细胞凋亡等中扮演着重要角色^[12-13];(3)常染色体显性遗传(ADHED)(MIM129490),由 2q11-13 的 EDAR 基因(Gene ID10913)突变引起,共有 12 个外显子,编码的 EDA 受体蛋白(EDAR),属于 TNF 家族成员^[12-15];(4)常染色体隐性遗传(ARHED)(MIM224900),由 EDAR 基因(Gene ID10913)和 1q42.3-43 与

凋亡相关 *EDAR* 基因 (*EDARADD*) (Gene ID128178) 变异引起^[12,14]。*EDA-A1* 为 HED 主要致病基因, 编码含 391 个氨基酸的蛋白 (*EDA-A1*)^[3,10]。*EDA-A1* 蛋白为 II 型跨膜蛋白, 属于 TNF 配体家族成员, 包括 1 个短的细胞外区域、跨膜区、胶原区, 以及 TNF 配体亚基, 形成三聚体结构^[10,16-18]。*EDA-A1* 与受体 *EDAR* 结合, 可促进与程序性细胞死亡相关的 *EDAR* 结合, 激活其下游的 NF- κ B 信号传导^[17,19]。

目前, 国内外对 HED 多停留在病例报道和突变分析, 而对 *EDA-A1* 基因功能, 尤其是突变体对细胞活性的研究, 很少有报道。国外学者用 pCMV5-*EDA-A2* 瞬时转染人 MCF-7 和 COS-1 细胞, 免疫组织化学分析显示, 部分转染细胞细胞膜表面有强烈的表达信号, 部分细胞中 *EDA-A2* 表现为与内质网一致的微丝。MCF-7 细胞形态改变与 *EDA-A2* 的表达有关, 而且 *EDA-A2* 阳性的细胞出现凝集^[7]。甘云娜等^[20] 构建 pIRES2-EGFP-*EDA* 真核质粒, 转染人牙髓间充质细胞, 并获得稳定表达。本课题组构建 *EDA-A1* 基因突变体和野生型真核表达载体, 转染人脐静脉内皮细胞 ECV304, 采用 MTT 法和流式细胞技术评价细胞增殖活性的变化。结果显示, 与对照组相比, 突变体组 ECV 细胞增殖明显下降, 生长受到抑制, 这可能与 *EDA-A1* 基因突变体所表达蛋白质空间构型和生物学活性改变有关。然而, 野生型 *EDA-A1* 基因组 ECV 细胞增殖活性无明显改变。细胞周期是由一系列高度有序并循精确时相的 G₁、S、G₂、M 期构成, 相关基因的有序表达实现对细胞周期的调控。本研究发现, *EDA-A1* 基因突变体对细胞周期产生了影响, 使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期和 S 期。

本研究结果表明, *EDA-A1* 基因突变体对 ECV304 细胞增殖有明显抑制作用, 且突变体和野生型 *EDA-A1* 基因对细胞增殖和细胞周期有不同的生物学功能。此研究为进一步研究该基因在牙齿发育中的生物学作用、探讨 *EDA* 蛋白在 NF- κ B 信号传导通路中的作用奠定了实验基础。笔者下一步的工作是, 将 *EDA-A1* 基因转染口腔相关细胞系, 以进一步明确和揭示其在牙、颌、颌面发育中的作用。

参考文献:

- [1] 张晓霞, 冯海兰. 多个牙先天缺失的病例分析及临床分型[J]. 中华口腔医学杂志, 2003, 38(4): 266-268.
- [2] Plaisancié J, Bailleul-Forestier I, Gaston V, et al. Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia[J]. Am J Med Genet A, 2013, 161A(4): 671-678.
- [3] Yildirim M, Yorgancilar E, Gun R, et al. Ectodermal dysplasia; otolaryngologic evaluation of 23 cases[J]. Ear Nose Throat J, 2012, 91(2): E28-33.
- [4] 雷科, 王伦昌, 李龙江. 少汗型外胚层发育不良症患者机体产热以及耐热性研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(33): 4036-4038.
- [5] Mikkola ML. Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia[J]. Am J Med Genet A, 2009, 149A(9): 2031-2036.
- [6] Ulvmar MH, Sur I, Mémet S, et al. Timed NF-kappaB inhibition in skin reveals dual independent effects on development of HED/EDA and chronic inflammation[J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(11): 2584-2593.
- [7] Bayés M, Hartung AJ, Ezer S, et al. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(11): 1661-1669.
- [8] 雷科, 车团结, 王锦明, 等. 少汗型外胚层发育不良症 *EDA-A1* 基因突变分析及其真核表达载体的构建[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(6): 610-613.
- [9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 109-115.
- [10] Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, et al. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases[J]. Hum Mutat, 2011, 32(1): 70-72.
- [11] Mues G, Tardivel A, Willen L, et al. Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(1): 19-25.
- [12] Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, et al. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency[J]. Blood, 2012, 119(23): 5458-5466.
- [13] Roberts CM, Angus JE, Leach IH, et al. A novel NEMO gene mutation causing osteopetrosis, lymphoedema, hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency (OL-HED-ID)[J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(11): 1403-1407.
- [14] Bashyam MD, Chaudhary AK, Reddy EC, et al. A founder ectodysplasin A receptor (EDAR) mutation results in a high frequency of the autosomal recessive form of hypohidrotic ectodermal dysplasia in India[J]. Br J Dermatol, 2012, 166(4): 819-829.
- [15] Masui Y, Farooq M, Sato N, et al. A missense mutation in the death domain of EDAR abolishes the interaction with EDARADD and underlies hypohidrotic ectodermal dysplasia[J]. Dermatology, 2011, 223(1): 74-79.
- [16] Knecht AK, Hosemann KE, Kingsley DM. Constraints on utilization of the EDA-signaling pathway in threespine stickleback evolution[J]. Evol Dev, 2007, 9(2): 141-154.
- [17] Hu Y, Baud V, Oga T, et al. IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB[J]. Nature, 2001, 410(6829): 710-714.
- [18] Swee LK, Ingold-Salamin K, Tardivel A, et al. Biological activity of ectodysplasin A is conditioned by its collagen and heparan sulfate proteoglycan-binding domains[J]. J Biol Chem, 2009, 284(40): 27567-27576.
- [19] Courtney JM, Blackburn J, Sharpe PT. The Ectodysplasin and NF kappa B signalling pathways in odontogenesis[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(2): 159-163.
- [20] 甘云娜, 王忠义, 陈苏民, 等. 稳定转染 *EDA* 基因的人牙乳头间充质细胞的建立[J]. 口腔医学, 2006, 26(4): 270-272.