

利用吗啉代寡核苷酸技术下调早期斑马鱼胚胎 *lmna* 基因的初步研究

刘 丰^{1,2}, 黄慧敏^{1,2,3}, 王志华^{1,2}, 吴西军², 何志旭^{1,2,3}, 舒莉萍^{1,2,4}

(1. 贵州医科大学免疫学教研室, 贵阳, 贵州 550004; 2. 贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心, 贵阳, 贵州 550004;
3. 贵州医科大学附属医院儿科学教研室, 贵阳, 贵州 550004; 4. 贵州医科大学实验动物中心, 贵阳, 贵州 550004)

【摘要】 目的 利用吗啉代寡核苷酸技术建立下调斑马鱼 *lmna* 基因的技术方法。方法 在斑马鱼 *lmna* 基因序列中选择靶点, 设计针对斑马鱼 *lmna* 基因的吗啉代寡核苷酸序列 (*lmna*-MO), 构建能特异指示 *lmna* 基因表达的 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒, 并通过显微注射方式将二者共注入斑马鱼胚胎中, 通过观察胚胎中绿色荧光表达量反应 *lmna* 基因表达量, 并通过蛋白质印迹法检测胚胎中 lamin 蛋白表达量。结果 蛋白质印迹法检测斑马鱼体内 lamin 蛋白的表达, 分别有大小为 69 KD 和 62 KD 两种蛋白表达。设计并构建了 *lmna*-MO 和重组质粒 *lmna*-EGFP-pCS²⁺, 单独注射 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒后观察到从 6 hpf 到 96 hpf 胚胎均有绿色荧光蛋白表达; 二者共注射后观察到, 与对照组相比, 实验组从 6 hpf 至 30 hpf 胚胎中绿色荧光蛋白表达量均不同程度下降或消失; 蛋白质印迹实验结果显示实验组胚胎内 lamin 蛋白表达量明显下降。表明已成功下调了斑马鱼胚胎 *lmna* 基因表达。结论 可通过 *lmna*-MO 和重组质粒 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 共注射方法下调斑马鱼 *lmna* 基因表达, 并通过绿色荧光蛋白表达量反映下调效果。该方法可为深入研究人核纤层病提供良好的动物模型。

【关键词】 斑马鱼; *lmna*; 基因下调; 吗啉代寡核苷酸技术

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0085-06

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.08.014

Study on the *lmna* gene knockdown in zebrafish embryo with morpholino oligonucleotides

LIU Feng^{1,2}, HUANG Hui-min^{1,3}, WANG Zhi-hua^{1,2},
WU Xi-jun², HE Zhi-xu^{1,3}, SHU Li-ping^{1,2,4}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Regenerative Medicine, Stem Cell and Tissue Engineering Research Center and Sino-US Joint Laboratory for Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;
2. Department of Immunology, 3. Department of Pediatrics, 4. Laboratory Animal Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

【Abstract】 **Objective** Lamins are the major components of nuclear lamina underneath the inner nuclear membrane (INM). Lamins express in most cells and are involved in the whole process of growth, also play a major role in cell stability and embryonic development. Mutant in human LMNA gene may lead to a series of disorders, which are similar to

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助 (NO. 31260284)。

[作者简介] 刘丰 (1989 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病。

[通讯作者] 何志旭, 男, 博士, 教授, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病; 舒莉萍, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病, E-mail: gyslp_456@163.com。

progeria or other aging-associated syndrome. In this study, we report a new *lmna* knockdown animal model generated in our laboratory in order to provide a useful tool for studying laminopathies. **Methods** Two plasmids tagged to zebrafish *lmna* gene were designed based on morpholino oligonucleotides technology. Co-microinjected the plasmids into zebrafish embryos to knockdown *lmna* gene. Imaging and western blot detection were used to identify the mutants. **Results** Two different proteins, Lamin A/C, were expressed in the zebrafish embryos. Two plasmids *lmna*-MO and *lmna*-EGFP-pCS²⁺ were generated and co-microinjected into embryos. The results of imaging and western blot showed that the expression of *lmna* gene was downregulated in the zebrafish embryos. **Conclusions** Lamin A/C are expressed in zebrafish. *lmna* gene can be knocked down by the injection of *lmna*-MO and *lmna*-EGFP-pCS²⁺. This new animal model may be a powerful tool for study on laminopathies.

[Key words] Zebrafish; *lmna*; Gene knockdown; Morpholino oligonucleotides; Laminopathy

核纤层蛋白(lamins)属于V型中间纤维蛋白家族(intermediate filament, IF)成员,它是细胞骨架的重要组成部分,可维持核膜正常形态,同时影响DNA复制、DNA损伤修复和转录^[1,2]。Lamins及其相关蛋白的突变可导致人核纤层蛋白病,由于lamin A/C几乎表达于所有的细胞和组织,高度组织特异性和在相同基因不同突变位点导致的疾病的广泛性相对复杂。尽管国内外已进行大量研究,核纤层蛋白病潜在的分子机制仍亟待解释^[3-6]。

斑马鱼是近年新兴的重要模式生物体,其具有体外受精,胚胎透明,与人类基因高度同源,繁殖发育迅速,成熟快,体积小,可用于高通量大规模筛选突变型,便于建立疾病模型等优点^[7,8]。目前较前沿的基因下调方法有吗啉代寡核苷酸技术,该技术稳定且应用广泛,成本较低,不会被核酸酶所降解,水溶性好,对细胞无毒副作用,并且不会和人工合成的RNA一样,激活细胞干扰素的分泌,激发免疫应答,特异性好,是如今广泛应用于斑马鱼的高效基因下调方法之一^[9-10]。

本实验构建有增强绿色荧光蛋白(EGFP)标记的斑马鱼*lmna*基因的质粒,并设计靶向斑马鱼*lmna*基因的吗啉反义寡核苷酸,利用吗啉代寡核苷

酸技术下调斑马鱼*lmna*基因的表达。以绿色荧光蛋白表达量作为*lmna*表达下调的标志,从而建立下调*lmna*基因表达的斑马鱼动物模型,为核纤层病的深入研究提供动物模型。

1 材料和方法

1.1 吗啉代寡核苷酸序列设计

利用吗啉代寡核苷酸技术抑制内源性*lmna*基因的表达。吗啉代寡核苷酸针对基因编码起始位点ATG设计,作用于mRNA的翻译起始位点AUG附近或者AUG上游的5'非编码区(untranslation region, UTR)区域,它与mRNA的结合阻碍了核糖体的翻译起始复合体向翻译起始位点的移动,从而导致多肽的合成过程无法起始。由于ATG对于*lmna*基因的起始翻译有着至关重要的作用,所以设计吗啉代寡核苷酸时避开ATG起始区,于其5'UTR区设计反义的寡核苷酸,使得外源性mRNA翻译表达不受影响,如图1。*lmna*-MO的靶序列位于*lmna*基因的5'UTR端,control-MO的序列由无意的25个碱基序列组成,结构稳定却不与任何基因的mRNA结合,作为实验对照组。

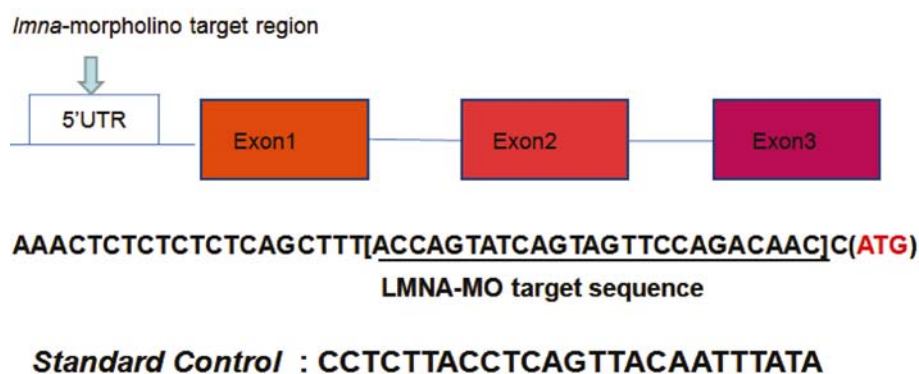


图1 吗啉代寡核苷酸设计示意图

Fig. 1 Illustration of the design of morpholino oligonucleotides

1.2 构建 *lmna*-pCS²⁺ 质粒

本实验以不含 5' UTR 端序列的 *lmna*-pCS²⁺ 质粒为模板,设计上游引物包括吗啉代寡核苷酸序列前后各加一个碱基(共 27 个),后加 ATG 起始密码子后的 20 个碱基;根据 pCS²⁺ 载体及目的基因选取限制性内切酶,上游引物的 5' 端选择加 BamHI 酶切位点,下游引物的 5' 端选择加 EcoRI 酶切位点,通过 PCR 法克隆两端含有合适酶切位点的 *lmna* 片段,长度为 501 bp。将 *lmna* 片段连入 pCS²⁺ 载体中,构建 *lmna*-pCS²⁺ 质粒。

1.3 构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒

该质粒用于吗啉代寡核苷酸的效能测定,双酶切 EGFP-pCS²⁺ 质粒,获取 EGFP 片段,将 EGFP 片段连接入 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒中,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒。

2 结果

2.1 蛋白质印迹实验验证斑马鱼中 *lmna* 基因编码蛋白质的表达

收集野生型斑马鱼胚胎,检测 *lmna* 基因表达蛋白,斑马鱼 *lmna* 基因表达的蛋白有两种,大小分别为 69 kDa 和 62 kDa,β-actin 为内参基因,大小为 43 kDa,如图 2 所示。

2.2 *lmna*-MO 及 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒构建

本实验针对 *lmna* 5' UTR 端的序列设计了一条针对 *lmna* 5' UTR 的反义寡核苷酸序列,同时用 control-MO 作为对照。构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒,用于 *lmna*-MO 测效,检测是否能有效抑制 *lmna* 基因的表达。构建重组质粒的 *lmna* 片段主要是含有吗啉代寡核苷酸靶向的 5' UTR 序列,将克隆的 *lmna* 片段与 pCS²⁺ 载体通过 T4 连接酶进行粘性末端连接,构建 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒。将 EGFP 片段插入 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒中,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒。利用 PCR 法克隆 *lmna* 片段,约 501 bp,如图 3 所示。

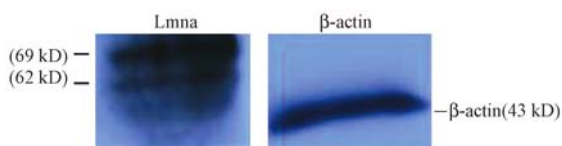


图 2 斑马鱼中 *lmna*、β-actin 基因编码蛋白质的表达

Fig. 2 Expression of the protein of *lmna* and β-actin gene in zebrafish

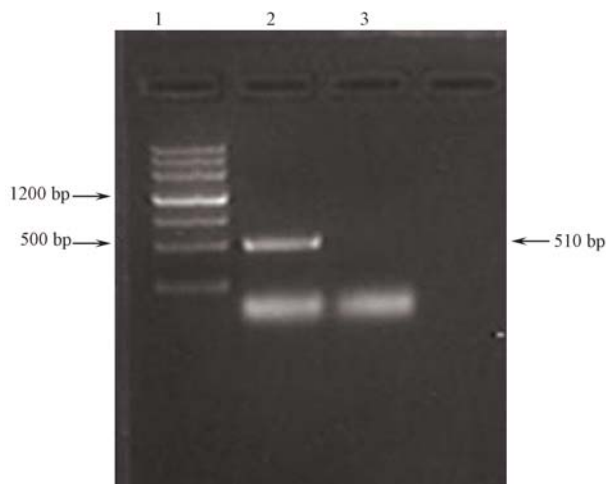
将克隆的 *lmna* 片段与 pCS²⁺ 载体通过 T4 连接酶进行粘性末端连接,构建 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒,将重组质粒行测序检测,测序结果显示重组质粒中含有吗啉代寡核苷酸靶向的 5' UTR 序列,如图 4 所示。

构建 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒成功之后,还需插入 EGFP 片段。利用 EcoRI 和 XbaI 两个限制性内切酶双酶切 EGFP-pCS²⁺ 重组质粒,得到 EGFP 片段大小约 717 bp,如图 5 所示。与 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒相连,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒。EGFP 片段不含 ATG,连于 *lmna* 后,使得 EGFP 特异性表达于 *lmna* 片段之后,可通过荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,即 *lmna* 基因的表达。

将酶切获得的 EGFP 片段插入 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒中,T4 连接酶进行粘性末端连接,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒,将重组质粒测序,结果如图 6 所示。

2.3 野生型斑马鱼胚胎 *lmna*-MO 及 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 显微注射

显微注射 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒入野生型斑马鱼单胚胎期胚胎,荧光显微镜下观察胚胎表达绿色荧光蛋白,可见 6 hpf (hours post-fertilization,受精后小时数)开始胚胎中有 *lmna* 基因广泛表达,直至 72 hpf 表达量开始下降,如图 7A-G 所示。证实该质粒中 EGFP 能有效示踪 *lmna* 基因的表达,可用于 *lmna*-MO 的效能鉴定。单独注射 *lmna*-EGFP-pCS²⁺



(1: DNA marker III, 2: *lmna* PCR 产物, 3: 空白对照)

图 3 斑马鱼 *lmna* 基因的 PCR 产物电泳图

(1: DNA marker III; 2: *lmna* PCR product; 3: Blank)

Fig. 3 Electrophoresis results of zebrafish *lmna* gene PCR products

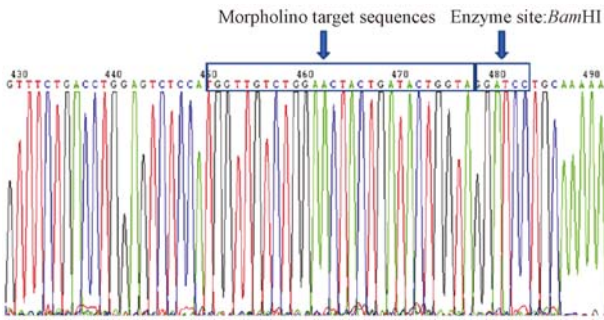
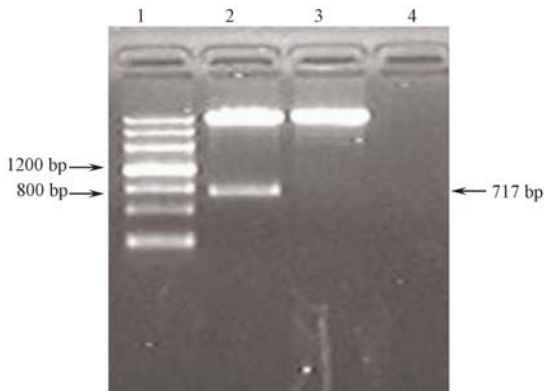


图 4 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒测序结果

Fig. 4 The sequencing result of *lmna*-pCS²⁺ plasmid



(1: DNA marker III; 2: EGFP-pCS²⁺ 酶切产物; 3: pCS²⁺ 酶切产物)

图 5 双酶切电泳图 (EcoRI 和 XbaI)

(1: DNA marker III; 2: EGFP-pCS²⁺; 3: pCS²⁺)

Fig. 5 The electrophoresis shows the results of double digestion with EcoRI and XbaI

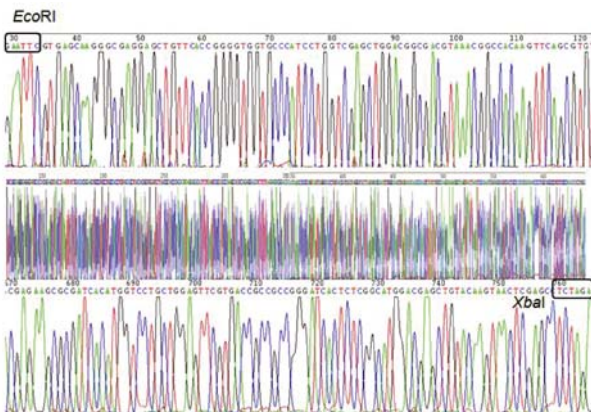
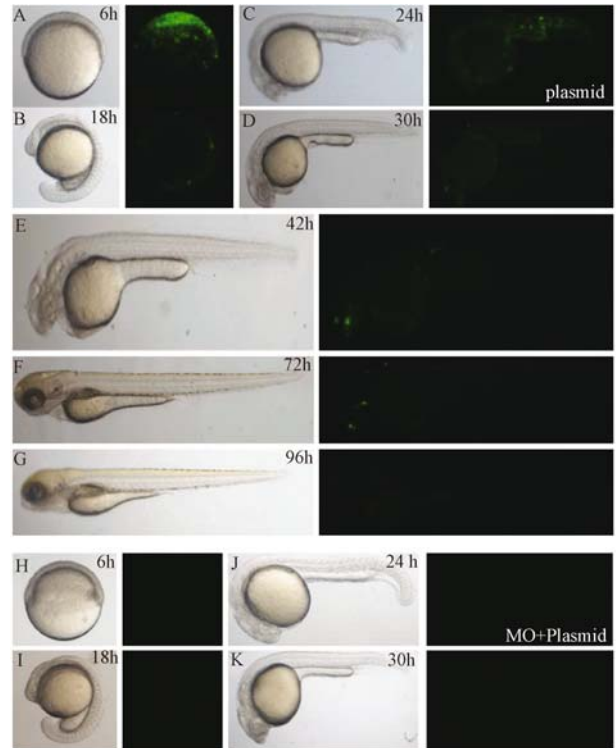


图 6 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒测序结果

Fig. 6 The sequencing results of *lmna*-EGFP-pCS²⁺ plasmid

质粒在荧光显微镜下可观察到绿色荧光在不同时期胚胎中泛在表达, 而将 *lmna*-MO 与 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒共注射入野生型斑马鱼单胚胎期胚胎后, 各时期胚胎中绿色荧光均消失, 即位于绿色荧



(A-G 图分别为不同时相胚胎的白场和荧光图;

H-K: *lmna*-MO、*lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒混合注射组)

图 7 *lmna*-MO、*lmna*-EGFP-pCS²⁺ 显微注射后的荧光表达情况

(A-G show the white field and fluorescence photos of different phase embryos; H-K: *lmna*-MO, *lmna*-EGFP-pCS²⁺ plasmid co-microinjected group)

Fig. 7 The fluorescent expression of the *lmna*-EGFP-pCS²⁺

光蛋白之前的 *lmna* 基因表达被下调, 如图 7H-K 所示。

2.4 蛋白质印迹实验检测显示实验组 lamin 蛋白表达量下降

采用蛋白质印迹实验检测发现对照组野生型斑马鱼胚胎表达两种 lamin 蛋白(即 lamins A/C)。实验组斑马鱼 *lmna* 基因 mRNA 翻译受阻, 蛋白合成出现障碍, 与对照组相较, lamin 蛋白表达水平明显降低, 如图 8 所示。

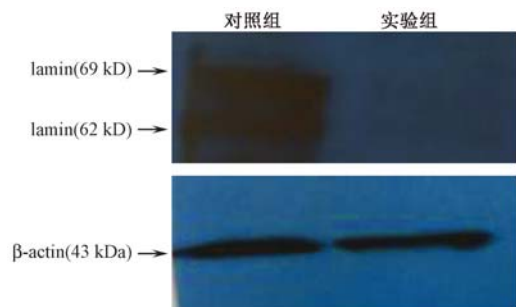


图 8 核纤层蛋白在斑马鱼体内的表达

Fig. 8 Expression of lamin protein in the zebrafish

3 讨论

核纤层普遍存在于高等动物的真核细胞的细胞核中,主要成分是核纤层蛋白,其向外与内层核膜上的蛋白结合,向内与染色质的特定区段结合^[11,12]。核纤层蛋白除了参与细胞核形状和大小的维持,还参与 DNA 的复制、有丝分裂中染色体的重组、细胞信号传导和细胞凋亡等过程^[13]。核纤层蛋白病是由于 LMNA 基因突变所导致的疾病,目前有 180 多个 LMNA 突变型被报道,但具体的发病机制仍不清楚,还需进一步研究与探讨^[14-16]。模式生物作为基因功能研究常用对象,其生长发育过程在长期的进化过程中具有高度的保守性,是研究人类发育、系统功能、疾病发生发展等的重要工具。目前常用的模式生物有大小鼠、斑马鱼、果蝇等,本实验选用斑马鱼为研究对象,斑马鱼具有胚胎透明、体外发育、体积小、繁殖率高及鱼种发育遗传背景清晰等优点使其成为研究脊椎动物,特别是研究人类发育和疾病的模式物种之一^[17-19]。

本实验用蛋白质印迹法检测斑马鱼中 lamin 蛋白的表达,检测出两个蛋白条带,即 lamin A/C。成功构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒用于吗啉代寡核苷酸测效。*lmna*-MO 序列位于 *lmna* 基因 5' UTR 端,即位于非编码区,通过 RT-PCR 法不可直接克隆针对 5' UTR 的 *lmna* 片段,故将 *lmna*-pCS²⁺ 质粒为模板,设计特异性引物,通过 PCR 法将 5' UTR 的非编码区片段克隆,并与 EGFP 片段相连,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒,该 EGFP 片段不含 ATG,其与 *lmna* 基因片段相连,通过 *lmna* 基因片段的 ATG 端编码翻译绿色荧光蛋白,并利用绿色荧光蛋白监测 *lmna* 基因的表达,用于吗啉代寡核苷酸测效,由于 *lmna* 基因和 EGFP 均由 ATG 起始密码子驱动表达,故在注射后其可在胚胎中泛在表达。*lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒显微注射入斑马鱼单细胞期胚胎中,于荧光显微镜下直接观察绿色荧光表达情况,荧光表达从 6 hpf 在全胚胎广泛表达,至 30 hpf 时逐渐减少以致 72 hpf 后完全消失,而共注射组从 6 hpf 至 30 hpf 均无绿色荧光蛋白表达,与对照组相比表明 *lmna*-MO 特异下调了斑马鱼胚胎中 *lmna* 基因的表达量;而 72 hpf 之后荧光蛋白表达的减少则可能由于 MO 的活性与重组质粒表达效应随胚胎发育的下降导致,故 *lmna*-MO 可特异下调早期斑马鱼胚胎 *lmna* 基因的表达量。

显微注射法是一种应用于基因功能研究的技术,通过显微注射相关基因的 DNA 和 mRNA 实现特定基因的过表达。利用吗啉代寡核苷酸技术建立特定基因下调模型,吗啉反义寡核苷酸 (phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMO) 属于第三代反义寡核苷酸,是逆向遗传学技术的一种。吗啉代寡核苷酸技术的原理基于 RNA 的五元核糖骨架被含有氮和氧的六元环替代,并相连于 A、T、C、G 等碱基。RNA-MO 进入细胞后,可以和目的基因 mRNA 结合,形成 RNA-RNA 双链,抑制细胞内正常 mRNA 的剪接过程,从而达到抑制基因表达的目的。吗啡啉有抑制起始翻译,减少传统反义寡核苷酸非特异性的效应,是一种新型反义寡核苷酸,具有良好的稳定性、溶解度和细胞渗透性,因此这种双链结构能稳定存在于生物体内,抵抗多种核酸酶和蛋白酶,不易降解,易溶于水,能在细胞中存留较长的时间。吗啉代寡核苷酸可以靶向于目的 mRNA,编码的蛋白质是多样化的,包括配体、跨膜受体、细胞内的蛋白质和转录因子。本实验设计的吗啉代寡核苷酸序列与目的基因 mRNA 5' 翻译起始序列附近大小为 25 个碱基序列互补,在目的基因 mRNA 5' 端形成稳定的 RNA-RNA 双链,通过阻碍 mRNA 和核糖体的结合而阻断 *lmna* 基因的起始翻译过程。将 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒与特异性的吗啉代寡核苷酸共注射入斑马鱼单细胞期胚胎中,各时相胚胎中绿色荧光均消失,即位于绿色荧光蛋白之前的 *lmna* 基因表达被下调,说明 *lmna*-MO 可以有效下调 *lmna* 基因的表达。蛋白质印迹实验结果同样证实了实验组斑马鱼 *lmna* 基因 mRNA 翻译受阻,蛋白合成出现障碍,与对照组相比,*lmna* 蛋白表达水平明显降低。说明实验组斑马鱼体内 *lmna* 蛋白已被下调。

本实验成功构建了吗啉代寡核苷酸技术下调斑马鱼 *lmna* 基因表达所需的重组质粒 *lmna*-MO 及可用于特异性指示 *lmna* 基因下调的重组质粒 *lmna*-EGFP-pCS²⁺。通过显微注射的方法将两者共注射入野生型斑马鱼单细胞期胚胎中,通过绿色荧光蛋白表达量反应 *lmna* 基因表达量。成功建立了下调 *lmna* 基因的斑马鱼模型,该模型为深入研究人核纤层病提供了良好的动物模型。

参考文献:

- [1] Gordon LB, Rothman FG, López-Otín C, et al. Progeria: a paradigm for translational medicine [J]. Cell, 2014, 156(3):

- 400–407.
- [2] Prokocimer M, Barkan R, Gruenbaum Y. Hutchinson-Gilford progeria syndrome through the lens of transcription [J]. *Aging Cell*, 2013, 12(4): 533–543.
- [3] Scaffidi P, Gordon L, Misteli T. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(11): e395.
- [4] Al-Saaidi R, Bross P. Do lamin A and lamin C have unique roles? [J]. *Chromosoma*, 2015;124(1): 1–12.
- [5] Davidson PM, Lammerding J. Broken nuclei — lamins, nuclear mechanics, and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(4): 247–256.
- [6] Kind J, van Steensel B. Stochastic genome-nuclear lamina interactions: modulating roles of Lamin A and BAF [J]. *Nucleus*, 2014, 5(2): 124–130.
- [7] Shu LP, Zhou ZW, Zhou T, et al. Ectopic expression of Hoxb4a in hemangioblasts promotes hematopoietic development in early embryogenesis of zebrafish [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(12): 1275–1286.
- [8] 刘静, 何嘉玲, 暴国, 等. 应用 TALEN 技术敲除 *gata4* 基因建立斑马鱼先天性心脏病模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(4): 1–7, 13
- [9] Ibrahim MX, Sayin VI, Akula MK, et al. Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria [J]. *Science*, 2013, 340(6138): 1330–1333.
- [10] Liu B, Zhou Z. Lamin A/C, laminopathies and premature ageing [J]. *Histol Histopathol*. 2008, 23(6):747–763.
- [11] Camozzi D, Capanni C, Cenni V, et al. Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics. Focus on laminopathies [J]. *Nucleus*, 2014, 5(5): 427–440.
- [12] Hirtle-Lewis M, Desbiens K, Ruel I, et al. The genetics of dilated cardiomyopathy: a prioritized candidate gene study of LMNA, TNNT2, TCAP, and PLN [J]. *Clin Cardiol*, 2013, 36(10): 628–633.
- [13] Barthélémy F, Navarro C, Fayek R, et al. Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(8):1051–1061.
- [14] Hadj-Rabia S, Mashiah J, Roll P, et al. A new lamin A mutation associated with acrogeria syndrome [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(8): 2274–2277.
- [15] Malashicheva A, Bogdanova M, Zbirnyk A, et al. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner [J]. *Mol Genet MeTab*, 2015, 115(2–3): 118–127.
- [16] Yang SH, Procaccia S, Jung HJ, et al. Mice that express farnesylated versions of prelamin A in neurons develop achalasia [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(10): 2826–2840.
- [17] Berman JN, Kanki JP, Look TA. Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33: 997–1006.
- [18] Davidson AJ, Zon LI. The ‘definitive’ (and ‘primitive’) guide to zebrafish hematopoiesis [J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7233–7246.
- [19] 舒莉萍, 何志旭, 姚冬静, 等. 野生型斑马鱼胚胎中 *hoxd3* 基因 mRNA 的表达谱 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2012, 41(1): 69–74.
- [修回日期]2016–04–18

(上接第 74 页)

- [9] Bai C, Fukuda N, Song Y, et al. Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103: 555–561.
- [10] Delclaux C, Rezaiguia RS, Delacourt C, et al. Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats [J]. *Am J Physiol*, 1997; 273: L104–L112.
- [修回日期]2016–05–30