

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0001-04

机遇和挑战——CD4⁺ T 淋巴细胞免疫介导疫苗发展的现状和面临的问题

徐沪济(第二军医大学免疫研究所, 上海 200433)

纵观医学研究发展史,最伟大的成就莫过于疫苗的问世及其预防接种。目前,发达国家投入使用的疫苗有12~13种,发展中国家有6~7种,这些疫苗的预防接种每年挽救了数百万人的生命。假如能成功地研制并使用艾滋病、结核、疟疾等疾病的疫苗,每年又将有成百万人的生命得以挽救。因此疫苗的研制仍然是当前医学研究者面临的最迫切最严峻的挑战之一^[1]。疫苗的生产已由过去的减毒疫苗(attenuated vaccine)和灭活疫苗(inactivated vaccine)发展成与病原体抗原分子关系更密切的蛋白疫苗(protein vaccine)、核酸疫苗(DNA vaccine)、多肽疫苗(peptide vaccine)以及抗原决定簇依赖的疫苗(epitope based vaccine)。这些新型疫苗的使用极大地减少了减毒疫苗和灭活疫苗引起的副作用。然而上述疫苗的研制必须克隆和鉴定能引起免疫保护的病原体抗原分子。目前在艾滋病和疟疾等重要传染性疾病的 研究中已发现了许多抗原,可是使用这些已鉴定的抗原制作的疫苗并不能够取得完全的免疫保护作用。因此获得真正有效疫苗,不仅有赖于鉴定克隆能有效诱导免疫保护的抗原,还有赖于研究和评估其抗原诱发的免疫保护机制。由此可见,重要传染病疫苗的相关基础研究是发展疫苗并战胜传染性 疾病最关键的环节。本文将疫苗研究近况尤其是疟疾疫苗发展的现状和面临的问题作一综述介绍。

1 疟疾疫苗的发展史

疟疾至今仍是全球危害最大的寄生虫传染病。据世界卫生组织统计,近90个国家约40亿人口面临疟疾感染的威胁。每年感染人数达5亿人口之多,其中死亡高达2~3百万,这其中又以儿童及孕妇为高危人群。由此可见,疟疾这单一疾病对人类健康和经济造成的冲击和损害难以估量。疟原虫在感染人体以后分两期发展。孢子(sporozoite)随按蚊唾液注入人体后,侵入肝细胞进行裂体增殖发育成裂子体(schizont),发育成熟后的裂子体内含有大量的裂殖子(merozoite)。当被寄生的肝细胞破裂后,大量裂殖子释放进入血循环。裂殖子在血循环中再侵入成熟的红细胞。在红细胞内发育、增殖、成熟以后再破裂,感染下一个红细胞。因此有相对应于肝期和血期的疫苗研制^[2]。既往的研究主要集中于肝期疫苗的发展,但感染患者的临床症状及体征是红

细胞感染期病理生理所致,所以研制血期感染的疟原虫疫苗是目前最引人注目的研究方向^[3,4]。

目前对血期疟疾疫苗的开发及研究有3个主攻方向^[3,4]:(1)研发抗表达在感染后红细胞膜表面的疟原虫抗原的疫苗;(2)研发抗裂殖子膜表面抗原的疫苗;(3)研发以细胞免疫为介导的疟疾疫苗。

临床及实验室的研究表明在多次重复感染疟疾之后,宿主体内可以产生针对表达在被疟原虫感染的红细胞膜上的多簇性疟原虫抗原(variant antigens, PfEMP)的抗体。鉴定这些抗原及诱导其保护性抗体的产生具有极大的挑战性及困难性。因为这些多变的抗原群品种繁多,故产生于一定抗原的抗体仅能作用于有该抗原表达的疟原虫^[5]。因此临床上依赖这些抗体产生的保护作用有赖于反复多次的长期感染,并产生品种繁多的抗体。故第一种疫苗的研制及开发有很大的局限性和困难性。目前更进一步的发展手段是直接开发研究上述第二种抗疟原虫裂殖子膜表面抗原的疫苗,如AMA-1和MSP1-19。但这种疫苗的发展存在着类似于第一种疫苗的局限性和困难性。因为这些抗原依然是多源性表达。此外,实验证实由这类疫苗诱导的免疫保护必须依赖于高效价的抗体存在,且这些抗体的产生也有赖于细胞免疫的介导^[3]。由此可见,目前最有前途的疟疾疫苗发展方法是开发上述第三种疫苗,即细胞免疫介导的疫苗,因为疟原虫为细胞内感染^[3,4]。

2 细胞介导免疫在抗疟感染中的作用

早已有文献推测细胞介导的免疫(CMI)在天然抗疟免疫中起到关键性作用。Weidanz及其同事最初的研究表明B细胞缺陷鼠在自然感染疟疾后可产生免疫力^[6]。因为这类小鼠缺乏B淋巴细胞,所以不能产生抗体,故此免疫保护作用归功于细胞介导的免疫。此后在用去除CD4⁺T淋巴细胞的小鼠试验中进一步证实,这些小鼠的疟疾感染率会显著升高。同样,给小鼠输入疟原虫特异性CD4⁺T淋巴细胞,发现小鼠的感染率下

[基金项目] 国家自然科学基金(30371286);上海市科委基金(04JC14007);军队人才基金

[作者简介] 徐沪济(1961-),男,上海人,教授,主要从事临床和基础免疫学研究

降^[7]。这些结果更直接证实这种细胞免疫介导的效应细胞是由 CD4⁺ T 淋巴细胞介导的。Taylor-Robinson 和同事更进一步证明 Th1 和 Th2 细胞都能以不同的免疫机制控制疟疾感染^[8]。CD4⁺ T 细胞在缺少抗体的情况下能杀伤虫体,表现为 Th1 表型,这与临床观察到的 IFN- γ 参与的抗疟感染结果相一致^[9]。

因为疟原虫可以在 MHC 抗原表达缺陷的红细胞中生长,一些学者对 CD4⁺ T 细胞控制疟原虫生长的能力表示怀疑。但已有的资料显示,CD4⁺ T 活化后的炎性分子(IFN- γ , TNF- α)可以激活巨噬细胞分泌活性氧介质和一氧化氮,二者皆可以杀死虫体。上述作用可能发生在脾脏,在其边缘窦处血流缓慢,使得受感染的红细胞被边缘区的巨噬细胞清除掉。因此,表达在抗原提呈细胞上的疟原虫抗原表位可以特异性激活疟原虫特异性 CD4⁺ T 细胞,然后激活的 CD4⁺ T 细胞通过上述炎性分子非特异性的杀死虫体^[10]。

新近的研究采用蛋白组学技术,已成功的克隆和鉴定了第一个能诱导细胞免疫的疟原虫抗原。这个抗原的分子为次黄嘌呤-鸟嘌呤-黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HGXPRT)^[11]。采用基因重组的 HGXPRT 抗原建立的特异性的 CD4⁺ T 淋巴细胞在输入鼠体内可以对鼠产生免疫保护作用。此外在 MSPI₁₁₉上也发现了一些细胞免疫的抗原决定簇^[12]。也有研究显示用顶膜抗原 1(AMA1)免疫的 B 细胞缺陷小鼠,也可产生部分免疫保护作用^[13]。因此多个疟原虫体抗原都可作为 CD4⁺ T 细胞的作用靶点。

3 疟疾感染后 T 细胞凋亡与免疫逃逸

尽管 CD4⁺ T 细胞在调控疟疾感染中起到关键作用,但是对疟疾产生免疫力的过程较慢,在疫区的人通常需要 5 年以上。且临床观察到若感染者离开疫区后免疫力很快丧失,提示这种免疫记忆是有限的,其机理不明。它可能与疟疾抗原的免疫原性低、抗原变异和多态性或疟疾感染导致宿主的免疫抑制等有关^[1]。

众所周知,病原体有多种方式逃避、抵抗和反攻宿主免疫系统,以便使其在被感染的细胞中存活、完全成熟和播散^[14]。为避免免疫攻击,病原体能够干扰抗原加工和提呈,或者使表位发生突变来逃避免疫识别,此在病毒感染中已有多项研究证实。在疟疾感染时也是如此,感染后的红细胞可以阻碍树突状细胞的成熟,得以达到免疫逃逸^[15]。除此以外,病原体能编码某些蛋白阻止被感染细胞的凋亡,从而抵抗免疫攻击。在病毒颗粒中已经发现许多这样的蛋白,如 HIV 中 Nef、肝炎病毒相关的卡波西肉瘤中 vFLIP^[14],但在疟疾虫体中尚未发现此类蛋白。更为重要的是,病原体能够反过来攻击免疫

系统。抗感染免疫后反应产生大量活化的效应 T 细胞,然后多数细胞经凋亡被清除。感染时免疫细胞存活或凋亡之间的平衡是极为重要的,因其可以影响保护性记忆细胞的生成及清除可能有害的活化 T 细胞。而另一方面,病原体可利用凋亡机理来清除活化的效应 T 淋巴细胞,从而避免病原体被特异性 T 淋巴细胞清除。已有临床研究表明急性恶性疟感染后患者体内凋亡细胞比例增加,且凋亡的细胞主要是 CD4⁺ T 细胞。动物实验也证实,转入裸鼠的被 CFSE 标记疟原虫特异性 CD4⁺ T 细胞在感染后丢失,表明疟原虫特异性 CD4⁺ T 淋巴细胞在清除疟原虫的同时,也被疟原虫诱导凋亡^[16]。

疟疾感染后 CD4⁺ T 细胞凋亡的机理仍不清楚,凋亡受促凋亡和抗凋亡分子相互作用的严格调控。已经明确凋亡体系的活化有三个主要的机制,包括生存信号的退出如生长因子、细胞周期中拮抗信号的干预以及细胞表面特定分子的识别^[17]。疟疾虫体可能利用其中一种或所有途径对抗免疫系统。然而,我们的研究资料表明疟疾感染时 IFN- γ 可能参与 T 淋巴细胞的凋亡,提示了 IFN- γ 除了参与杀伤病原体外还有其它的功能。至于疟疾感染时 IFN- γ 单独还是联合其它分子如一氧化氮、B7-H1 共同调节凋亡值得进一步研究。显然更重要的是必须弄清驱动疟原虫特异性 CD4⁺ T 细胞凋亡的抗原,这将更加深入地阐明对疟疾产生免疫的特性,对提出疟疾疫苗的制备方法有重要指导意义。

4 疫苗制备策略及免疫学挑战

目前我们对疟疾免疫的理解主要得益于 1983 年疟疾抗原的克隆^[18]。这项研究促进了疟疾疫苗的研究,因为当时唯一的方法是利用人红细胞在体外培养疟原虫,提取其原生质抗原,其手段非常繁琐和棘手。当时在整体上"较新"的策略是使用免疫血清从表达库中挑选各种克隆,然后制出重组抗原用于疫苗研究。尽管 1983 年就克隆了一些抗原,但直到 2002 年才发表了第一项用重组抗原制备的血期疫苗的有效性试验,该研究在 120 位巴布亚新几内亚儿童中进行^[19]。在一组接种了 3 种重组抗原(MSP1, MSP2, RESA)的儿童中,虫体感染率下降 62%。该项有前途的研究需进一步重复验证。在该研究之前也有一系列用合成多聚多肽进行的疫苗研究。在早期研究中该疫苗显示出了巨大前景,但在不同的条件下不同的研究者均未能重复出该结果,而其它一些使用重组抗原的研究进展缓慢或中途而废。显然制作疟疾疫苗的挑战是巨大地,因为在血液期抗原首次克隆后的 21 年后的今天仍未制备出有效疫苗,而且乐观估计疫苗的制备至少仍需 10 年。因此,有必要采用一些特殊手段来增强感染者的免疫保护能力,尤其是克服免疫

逃逸产生的记忆性 T 细胞丢失。

5 限制免疫逃逸的策略

限制免疫逃逸的策略必须要诱导一种免疫,这种免疫不能与天然情况下病原体所诱导的免疫相似或相近,因为在自然感染过程中疟原虫病原体非常善于逃避随后的免疫反应。在上面的讨论中我们试图阐述病原体逃避免疫的一些机制。一个主要挑战是寻找另一个免疫途径来限制免疫逃避,控制病原体生存。

5.1 与转运蛋白结合

成功制备亚单位疫苗例如 MSPI₁₁₉ 的一个主要障碍是其分子太小,使得一部分分子无免疫原性。因此制备疟疾疫苗的一个挑战就是设计一种疫苗,可以被不同的 HLA 群体识别。为克服这一障碍,一些研究利用额外的 T 细胞表位(用已经明确的表位或者含有表位的蛋白)来辅助 B 细胞,从而提高基于小亚单位疫苗的免疫原性^[20]。实验研究也表明一些小鼠对 MSPI₁₁₉ 的免疫无反应性,但将 MSPI₁₁₉ 与白喉类毒素(DT)结合后可使得这些原本对 MSPI₁₁₉ 无免疫反应的小鼠产生相应的免疫反应^[21]。而且,也有证据显示已有的针对 DT 的免疫反应实际上可以增加接种 MSPI₁₁₉-DT 后的对 MSPI₁₁₉ 的抗体反应。此也提示假如将 DT 和 MSPI₁₁₉ 结合后来免疫疫区人群,这些人群由于常规接种疫苗已产生的对 DT 的免疫性可能有助于起对 MSPI₁₁₉ 免疫接种效应。

5.2 隐源性抗原决定簇

一个更常用的限制免疫逃避的方法是不采用在自然感染后的免疫优势抗原和其抗原决定簇作为免疫原。这些免疫优势抗原诱导的效应 T 淋巴细胞在与病原体直接接触后往往会由于凋亡而在体内丢失,因此不能达到预期接种的目的。相反,隐源性抗原决定簇(cryptic epitopes)在自然感染过程中往往没有免疫原性或免疫原性很弱。但是已有资料显示,如果将它们合成为非天然的结合形式,比如与小的合成多肽结合后有时可以诱导出惊人的免疫反应,其诱导的效应细胞不仅可以识别整个蛋白质抗原分子,也可识别整个病原体。已经鉴定出一些疟疾蛋白的隐源性蛋白抗原表位。例如在 AMA1 中已经发现一个代表隐源性表位的多肽段。用该多肽免疫产生的特异性的 T 细胞可有效的杀伤疟原虫^[22]。因此一个可行的方法是将这些隐源性表位集中在一起免疫高危人群,产生相应的效应细胞,识别这个疟原虫蛋白抗原,从而达到预防接种的目的。

5.3 细胞介导的免疫

另一个不同的策略是发展一种在自然感染状态下不能被诱导的但一旦诱导就可产生免疫保护作用的疫苗。如前所述,自然感染过程中,细胞介导的免疫反应

往往由于效应细胞的凋亡而不能达到免疫保护功效。鉴于此,一种可能的策略是设法在最大程度上迅速诱导出细胞免疫介导的抗疟反应,在其效应细胞不发生凋亡的前提下迅速消灭病原体。新近的研究包括 HCV 实验资料都已表明^[9,23],在人体中使用超低量病原体感染可以诱导出有效的 Th1 型细胞介导的免疫反应,且可有效的控制感染。因此该方面的研究有待进一步深入。

6 结论

疟疾疫苗的制备有待更多的研究,但是单一的抗原亚单位疫苗不可能保护广大人群对抗不同类型的疟原虫感染。既然针对疟疾的天然免疫需要数年才能产生并且至多仅有部分能力根除虫体,所以必须研究新的疫苗使人类免疫系统不同于自然状态下的方式暴露于抗原,并诱导出高效快速的保护性免疫。挑战是巨大的。本文试图从免疫学的角度概述一些挑战,以便提出合理的策略并最终研制出有效的疫苗。

致谢:本文的编辑工作得到程昉和吴歆医生的支持,在此表示感谢。

[关键词] 疫苗; CD4⁺ T 细胞; 疟疾

[中图分类号] R392.7 [文献标识码] C

[参考文献]

- [1] Good MF, Stanicic D, Xu H, *et al.* The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of plasmodium[J]. *Immunol Rev*, 2004, 201: 254-267.
- [2] Moorthy VS, Good MF, Hill AV. Malaria vaccine developments [J]. *Lancet*, 2004, 363(9403): 150-156.
- [3] Good MF. Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? [J] *Nat Rev Immunol*, 2001, 1: 117-125.
- [4] Good MF, Xu H, Batzloff M. Adapting immunity with subunit vaccines. Examples of some case studies with malaria and group A streptococcus[J]. *Int J Parasitol*, 2002, 32: 575-580.
- [5] Bull PC, Lowe BS, Kortok M, *et al.* Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria[J]. *Nat Med*, 1998, 4: 358-360.
- [6] Grun JL, Weidanz WP. Antibody-independent immunity to reinfection malaria in B-cell-deficient mice[J]. *Infect Immun*, 1983, 41: 1197-1204.
- [7] Amante FH, Good MF. Prolonged Th1-like response generated by a Plasmodium yoelii-specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice[J]. *Parasite Immunol*, 1997, 19(3): 111-126.
- [8] Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, *et al.* The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection[J]. *Science*, 1993, 260: 1931-1934.
- [9] Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, *et al.* Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with Plasmodium falciparum[J]. *Lancet*, 2002, 360: 610-617.
- [10] Su Z, Stevenson MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection[J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 4399-4406.
- [11] Makobongo MO, Riding G, Xu H, *et al.* The purine salvage enzyme hypoxanthine guanine xanthine phosphoribosyl transferase is a major target antigen for cell-mediated immunity to malaria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 2628-2633.

[12] Wipasa J, Hirunpetchcharat C, Mahakhunkijcharoen Y, *et al.* Identification of T cell epitopes on the 33 kDa of *P. yoelii* merozoite surface protein-1 and their antibody-independent protective role in immunity to blood stage malaria[J]. *J Immunol*, 2002, 169: 944-951.

[13] Xu H, Hodder AN, Yan H, *et al.* CD4⁺ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection following apical membrane antigen 1 immunization[J]. *J Immunol*, 2000, 165: 389-396.

[14] Xu XN, Screation GR, McMichael AJ. Virus infections: Escape, resistance, and counterattack[J]. *Immunity*, 2001, 15(6): 867-870.

[15] Ocana-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells[J]. *J Exp Med*, 2003, 197: 141-151.

[16] Xu H, Wipasa J, Yan H, *et al.* The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection [J]. *J Exp Med*, 2002, 195(7): 881-892.

[17] Screation G, Xu XN. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members[J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12: 316-322.

[18] Kemp DJ, Coppel RL, Cowman AF, *et al.* Expression of *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in *E. coli*. Detection with antibodies from immune humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80: 3787-3791.

[19] Genton B, Betuela I, Felger I, *et al.* A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts

selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185: 820-827.

[20] Ahlborg N, Ling IT, Howard W, *et al.* Protective immune responses to the 42-kilodalton (kDa) region of *plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 are induced by the C-Terminal 19-kDa region but not by the adjacent 33-kDa region[J]. *Infect Immun*, 2002, 70: 820-825.

[21] Stanisc DI, Martin LB, Liu XQ, *et al.* Analysis of immunological nonresponsiveness to the 19-kilodalton fragment of merozoite surface Protein 1 of *Plasmodium yoelii*: Rescue by chemical conjugation to diphtheria toxoid (DT) and enhancement of immunogenicity by prior DT vaccination[J]. *Infect Immun*, 2003, 71: 5700-5713.

[22] Amante FH, Crewther PF, Anders RF, *et al.* A cryptic T cell epitope on the apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* adami can prime for an anamnestic antibody response: Implications for malaria vaccine design[J]. *J Immunol*, 1997, 159: 5535-5544.

[23] Shata MT, Tricoche N, Perkus M, *et al.* Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees[J]. *Virology*, 2003, 314(2): 601-616.

[收稿日期] 2005 - 03 - 10 [修回日期] 2005 - 03 - 20
 [本文编辑] 韩丹,王莹

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0004-01

白喉毒素-(Gly₄ Ser)₂-α 促黑素重组蛋白的研究

李泽鸿^{1,2}, 张国利¹, 岳玉环¹, 邱业峰¹, 吴广谋¹, 朱平¹(1. 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所; 2. 吉林农业大学测试中心, 长春 130062)

白喉毒素(DT)是由白喉棒状杆菌所产生的分子量为 58 kD 的外毒素,它在胰蛋白酶的作用下可降解为 A 和 B 两个片段, B 片段能与敏感宿主细胞的特异受体结合并能将 A 片段转位到胞浆, A 片段具有核糖体依赖的酶活性,它通过灭活真核细胞的肽链延长因子 II 来阻断细胞蛋白合成。

α 促黑素细胞激素来源于其前体激素阿黑皮素原,能与表面上具有其受体的细胞特异性结合。已有证据表明,黑色素瘤细胞表面受体的密度比正常黑色素细胞高 40% ~ 200%。

我们利用 DT 作为细胞毒性部分,根据黑色素瘤细胞表面高表达的激素受体,将 α 促黑素细胞激素基因与 DT 基因连接,构建了白喉毒素-(Gly₄ Ser)₂-α 促黑素[DAB₃₈₉-(Gly₄ Ser)₂-αMSH]融合基因,并在大肠杆菌中高效表达。在一定程度上克服了第一代免疫毒素稳定性差、半衰期短、分子量较大、免疫源性弱等不足。为下一步深入研究对恶性黑色素瘤等的特异性细胞毒作用奠定了基础。

参考 DAB₃₈₉ 基因的核苷酸序列及张国利等报道的 Liner 序列并且为了重组蛋白纯化的需要,设计并合成 2 条引物,利用 PCR 技术,以 pET28a/DAB₃₈₉(Gly₄ Ser)₂ EGF 为模板,扩增出 DAB₃₈₉-(Gly₄ Ser)₂-αMSH 片段,经特异性内切酶 Nco I, EcoR I 双酶切后,将基因片段插入到原核表达载体

pET28a(+)/ Nco I + EcoR I 酶切片段中,构建了原核重组表达质粒 pET28a/DAB₃₈₉-(Gly₄ Ser)₂-αMSH pET28a/DLM, 测序结果与设计相符。将质粒转化至表达菌 BL₂₁(入 DE3) 中,将重组表达菌 BL₂₁(DE3)pET28a/DLM 培养并经 IPTG 诱导后,经 SDS-PAGE 电泳检测表明,构建的菌株能高效地表达重组蛋白,而且是可溶性表达,用日本产 CS-9000 薄层扫描仪对表达带进行定量分析,重组蛋白约占菌体总蛋白的 29.2% 左右。免疫印迹分析显示, DAB₃₈₉-(Gly₄ Ser)₂-αMSH 重组蛋白可与马抗白喉毒素抗体发生特异性免疫反应。

本研究由于添加了亲和标记,使纯化过程更简便、快捷。融合蛋白的收率更高。我们在设计本实验时选择以 DAB₃₈₉ 为克隆对象,以期提高重组毒素的特异性细胞毒性。

本研究加入连接肽不仅合理而且提高了重组毒素的细胞毒性,可在临床应用中减少用药量,既节约了成本又减轻了免疫反应。为了便于重组蛋白的纯化,设计引物时加入了组氨酸 Tag 和 Xa 因子的酶切位点,以期在将来纯化蛋白时,简化方法并且降低生产成本。

[关键词] 白喉毒素; α 促黑素; 连接肽; 重组蛋白
 [中图分类号] R392.12 [文献标识码] D
 [收稿日期] 2004 - 06 - 17 [修回日期] 2004 - 08 - 10
 [本文编辑] 韩丹,王莹