

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2008 )03-0259-05

## 人内皮-单核活化多肽-2 的重组表达及其活性鉴定

高云, 王梁华, 任娜, 孙铭娟, 郭爱云, 焦炳华\* (第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

**[ 摘要 ]** 目的: 采用原核表达系统重组表达抗肿瘤细胞因子——人内皮-单核活化多肽 2( endothelial monocyte-activating polypeptide II, EMAP-II ), 并探讨重组 EMAP-II 的抗肿瘤生物学活性。方法: 采用 pMAL-p2x 表达系统和 BL-21 菌株克隆表达人 EMAP-II<sub>147-312</sub>, 对表达产物进行纯化。以发光底物法测定重组 EMAP-II 介导人脐静脉内皮细胞 ECV-304 产生组织因子的活性; 以流式细胞术测定其增强 ECV-304 细胞对于 TNF $\alpha$  致凋亡的敏感性; 以 MTT 法检测测定其对胰腺癌 SW1990 细胞增殖的抑制效果。结果: 测序证实 EMAP-II 编码序列被正确克隆进表达载体, 经诱导表达、纯化, 获得重组 EMAP-II 产物, 每克菌体(湿重)可获得约 500  $\mu$ g 的重组蛋白, 纯度为电泳纯。重组 EMAP-II 在体外培养条件下可使 ECV-304 细胞产生 TF 因子; 并可增强 ECV-304 细胞对于 TNF $\alpha$  介导凋亡的敏感性, 使凋亡率明显增加[ ( 16.6  $\pm$  2.5 )% vs ( 25.6  $\pm$  2.3 )% ,  $P < 0.01$  ]; 在一定的质量浓度( 1  $\mu$ g/ml )下, EMAP-II 对 SW1990 细胞的增殖有一定抑制作用(  $P < 0.05$  )。结论: 本研究采用原核表达系统 pMAL-p2x 可表达高纯度的重组 EMAP-II, 该因子具有良好的抗肿瘤生物学活性。

**[ 关键词 ]** 内皮-单核活化多肽 2; 克隆表达; 抗肿瘤; 增殖抑制; 凋亡

**[ 中图分类号 ]** Q71; R730.5 **[ 文献标志码 ]** A

## Expression of recombinant human endothelial monocyte-activating polypeptide II and determination of its activity

GAO Yun, WANG Liang-hua, REN Na, SUN Ming-juan, GUO Ai-yun, JIAO Bing-hua\* ( Department of Biochemical and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China )

**[ Abstract ] Objective:** To clone and express the recombinant human endothelial monocyte-activating polypeptide-II ( EMAP-II ) and identify its anti-tumor biological activities. **Methods:** EMAP-II<sub>147-312</sub> was expressed by the expression vector pMAL-p2x and *E. coli* BL-21 and the product was purified. The production of tissue factor ( TF ) in human umbilical vein endothelial cell ECV-304 mediated by the recombinant EMAP-II was determined by chemiluminescence substrate. The promoting effect of recombinant EMAP-II on TNF $\alpha$ -induced ECV-304 cell. Apoptosis was determined by flow cytometry. Its inhibitory effect on human pancreatic cancer cell SW1990 proliferation was determined by MTT method. **Results:** DNA sequencing verified that EMAP-II was correctly cloned. The molecular mass of the protein identified by SDS-PAGE was consistent with the theoretic value. The productivity of recombinant EMAP-II was 500  $\mu$ g per 1 g bacteria ( wet mass ). The purified product induced expression of tissue factor( TF ) in ECV-304 cells; it also enhanced the sensitivity of ECV-304 cells to the apoptotic effect of TNF $\alpha$  [ ( 16.6  $\pm$  2.5 )% vs [ 25.6  $\pm$  2.3 ]% ,  $P < 0.01$  ), with the apoptotic rate reaching ( 25.6  $\pm$  2.3 )% . EMAP-II protein ( 1  $\mu$ g/ml ) inhibited the proliferation of SW1990 cells. **Conclusion:** The recombinant EMAP-II can be cloned and expressed correctly in the pMAL-p2x expression system, and the recombinant product has effective anti-tumor effect.

**[ Key words ]** endothelial monocyte-activating polypeptide II ; cloning and expression; antitumor effect; suppression proliferation; apoptosis **[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15( 3 ): 259-263 ]**

内皮-单核活化多肽-2( endothelial monocyte-activating polypeptide-II, EMAP-II )是由 Kao 等<sup>[1]</sup>在甲基胆蒽诱导鼠纤维肉瘤的培养上清中发现的一种促炎症细胞因子, 该因子能作用于血管内皮细胞、淋巴细胞、成纤维细胞, 具有广泛的生物活性<sup>[2-7]</sup>。研

**[ 基金项目 ]** 上海市现代生物与新药产业发展基金资助项目( No. 024319115 )。Supported by Modern Industrial Development Foundation for Biology and New Drugs of Shanghai ( No. 024319115 )。

**[ 作者简介 ]** 高云( 1979- ), 男, 上海市人, 硕士, 助教, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

究<sup>[8-11]</sup>发现,在实体瘤动物中,EMAP-Ⅱ能抑制原发性或转移性肿瘤的生长、发展及转移;在体内条件下其与 TNF $\alpha$  联合使用,还能使某些对 TNF $\alpha$  不敏感的肿瘤发生敏感化。以上事实表明,EMAP-Ⅱ作为一个有前途的细胞因子将有可能应用于肿瘤防治领域。

虽然某些正在凋亡的胚胎细胞和肿瘤细胞可分泌 EMAP-Ⅱ,但要提取这种微量分泌的 EMAP-Ⅱ,并使具有治疗价值将十分困难<sup>[5]</sup>。病毒基因转染可生成内源性 EMAP-Ⅱ,但转染本身带来的许多不良反应妨碍它的应用<sup>[12]</sup>。通过重组表达和纯化获得大量的有活性的 EMAP-Ⅱ,将是肿瘤研究领域中有意义的工作。先前,国外已有人采用原核表达系统重组表达了人的 EMAP-Ⅱ蛋白<sup>[13]</sup>,但对于重组蛋白的生物活性尤其是与肿瘤相关的活性研究得较少。本研究拟采用新型的原核表达 pMAL 系统重组表达人 EMAP-Ⅱ蛋白,在正确克隆、表达并纯化的基础上对重组蛋白的有关活性进行鉴定,为进一步深入探讨 EMAP-Ⅱ体内外的生物学活性,尤其是抗肿瘤活性提供了实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

大肠杆菌 BL21 菌株、人肝细胞 cDNA 文库为本室保存。pMALTM 蛋白融合表达及纯化系统(含 pMAL-p2x 载体、Amylose 树脂、Xa 因子、抗标签蛋白抗血清等)购自 New England Biolabs 公司。PMD-18T 克隆载体购自 TaKaRa 公司。麦芽糖结合蛋白(maltose-binding protein, MBP)采用空载 pMAL-p2x 转化 BL-21 菌株并诱导表达产生。人脐静脉内皮细胞系 ECV-304、人胰腺癌细胞 SW1990 购自中科院上海生化所细胞资源中心,本室冻存。

### 1.2 重组 pMAL 表达质粒的构建

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中人 EMAP-Ⅱ 编码序列(NM\_004757 GI:45006985)以及 pMAL-p2x 质粒的读码框架,设计了两条引物,在上游引物 5' 端引入 *EcoR* I 位点,在下游引物 5' 端引入 *Bam*H I 位点。扩增产物为成熟 EMAP-Ⅱ 片段(147~312)。上游引物:CCGAATTCACAATGGCCGACTCTAAGC-CAATAG; 下游引物:CCGGATCCTTATTGATTC-CACTGTTG。

1.2.2 重组质粒构建及鉴定 采用 PCR 方法扩增 EMAP-Ⅱ 的编码序列,将其克隆进克隆型质粒 PMD-18T,转化大肠杆菌 BL-21 菌株。进行重组子鉴定。将鉴定正确的重组质粒用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶

切,和同样经过双酶切的 pMAL-p2x 质粒进行连接,转化 BL21 菌株,用菌落 PCR 和双酶切对进行重组子鉴定。对鉴定正确的重组质粒送交 Invitrogen 公司测序。

### 1.3 重组人 EMAP-Ⅱ 蛋白的诱导表达及纯化

1.3.1 重组人 EMAP-Ⅱ 蛋白的表达 将转化有重组质粒的 BL21 表达型菌株接种于含 Amp 的 LB 培养基,37 °C、180 r/min 下震荡 3~5 h,使  $D_{600}$  达到 0.5~0.8。加入化学诱导剂 IPTG,使其终浓度达到 0.3 mmol/L,继续培养 3~6 h,离心收集菌体。

1.3.2 重组蛋白的收集与纯化 将在 -70 °C 冻存过夜的菌体解冻,用 PBS 洗菌体 2 次。离心,去上清,加入过柱缓冲液,于冰水浴中将菌体超声破碎。7 000  $\times$  g 下离心 10 min,用过柱缓冲液平衡 Amylose 柱,将上清液上柱。用过柱缓冲液过柱,洗去杂蛋白,用洗脱缓冲液将目标蛋白洗脱下来。将洗脱的蛋白样品用 Amicon Ultra 离心超滤装置(Millipore 公司)离心,5 000  $\times$  g 下离心 15~20 min,对样品进行浓缩。将浓缩的样品按每 50  $\mu$ g 蛋白加入 0.5  $\mu$ g Xa 因子,4 °C 切割过夜,结果用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度分析。

### 1.4 发光底物法测定重组 EMAP-Ⅱ 介导 ECV-304 细胞表达组织因子

人脐静脉内皮细胞 ECV-304 培养于 MEM 培养液(含 10% 胎牛血清)中,以 0.25% (W/V) 的胰酶浓度将长至单层的 ECV-304 细胞消化,接种于 96 孔板,待细胞数生长至每孔 (1.0~1.5)  $\times$  10<sup>4</sup> 个时,加入样品(第 1 组为含纯化标签的 EMAP-Ⅱ;第 2 组为不含纯化标签的 EMAP-Ⅱ;第 3 组为标签蛋白,第 4 组为热灭活的 EMAP-Ⅱ;第 5 组为 EMAP-Ⅱ 标准品),37 °C 下温育 2 h,用 0.1 mol/L 的 NH<sub>4</sub>OH 预处理,接着用 10 mmol/L、pH 7.4 的 HEPES 缓冲液洗 2 次,加入同样的缓冲液(含 1 nmol/L 的人凝血因子 VIIa 和 200 nmol/L 的因子 X) 37 °C 温育 1 h,组织因子(tissue factor, TF)活性以 Factor Xa 产生速率来表示,而 Factor Xa 产生速率以产生发光底物浓度表示。

### 1.5 流式细胞术测定重组 EMAP-Ⅱ 增强 ECV-304 细胞对于 TNF $\alpha$ 致凋亡的敏感性

将细胞接种于 6 孔板,待细胞生长至 (3.0~4.0)  $\times$  10<sup>5</sup> 个/孔时,用 100 ng/ml 重组 EMAP-Ⅱ 预处理细胞 1 h,加入重组人 TNF $\alpha$  (终质量浓度为 10 ng/ml) 作用 4 h,同时设立对照(第 1 组对照组不加入任何样品;第 2 组仅加入 TNF $\alpha$ ;第 3 组仅加入重组 EMAP-Ⅱ;第 4 组用重组 EMAP-Ⅱ 预处理后加入

TNF $\alpha$ )。显微镜下观察细胞形态, 并采用 Annexin V-FITC 和 PI 双标记的流式细胞术测定细胞凋亡率。

### 1.6 MTT 法测定重组蛋白对 SW1990 细胞增殖的抑制作用

人胰管癌上皮细胞 SW1990 培养于 RPMI 1640 培养液(含 10% 胎牛血清)中, 用无血清培养液培养 24 h, 使细胞同步化, 按每孔  $1.5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板, 每组设 5 个复孔, 待细胞贴壁后, 加入重组 EMAP- II(终质量浓度为  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), 对照组加入 MBP 蛋白(终质量浓度为  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), 每隔 24 h 取出一板, 用 MTT 法测定细胞活力, 共测定 8 d, 绘制细胞生长曲线。

### 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据采用双样本异方差假设  $t$  检验, 采用 SPSS10.0 软件进行。

## 2 结果

### 2.1 重组 EMAP- II<sub>147-312</sub> 的克隆表达

采用设计的引物从 cDNA 文库中扩增的片段, 经克隆型载体扩增, 转入表达型载体 BL21, 重组质粒经双酶切电泳分析在大约 500 bp 处有一条带, 与 EMAP- II<sub>147-312</sub> 编码序列理论值大小相符(图 1)。将酶切鉴定正确的重组质粒送交测序, 其结果与 Genebank 中人 EMAP- II<sub>147-312</sub> 编码序列一致。

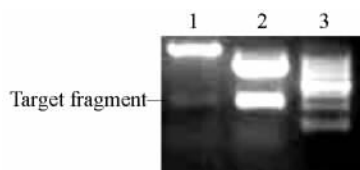


图 1 重组质粒 pMAL-EMAP- II<sub>147-312</sub> 的酶切鉴定

Fig. 1. Characterization of recombinant pMAL-EMAP- II<sub>147-312</sub> by restriction enzyme digestion

- 1: pMAL-EMAP- II<sub>147-312</sub> EcoR I / BamH I digestion;
- 2: pMD-18T-EMAP- II<sub>147-312</sub> EcoR I / BamH I digestion;
- 3: Marker III DNA ladder

### 2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

2.2.1 诱导表达后菌体总蛋白 SDS-PAGE 分析  
重组蛋白菌体超声破碎后, 总蛋白经 SDS-PAGE 分析, 在相对分子量大约为 58 000 处有一明显条带, 大小与 MBP-EMAP- II 理论值相符(图 2)。

2.2.2 目的蛋白浓缩纯化后的 SDS-PAGE 分析  
重组 EMAP- II 经过诱导表达、纯化、浓缩, SDS-PAGE 分析显示, 58 000 处出现明显条带。计算产

率, 每克菌体能得到约  $500 \mu\text{g}$  纯化蛋白。经 Xa 因子切割后, 在大约 36 000 和 22 000 处有两条带, 分别与 MBP 标签蛋白和 EMAP<sub>147-312</sub> 理论值相符。

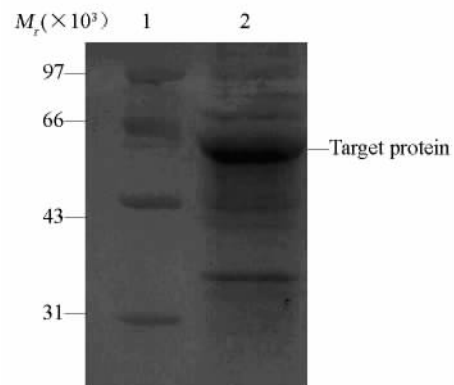


图 2 诱导表达后菌体总蛋白 SDS-PAGE 分析  
Fig. 2 Total protein of bacteria after induction of IPTG by SDS-PAGE

1: Protein marker; 2: Total protein in the BL21

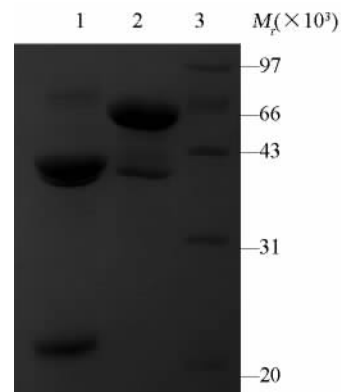


图 3 纯化及切割后重组 EMAP- II 的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 Analysis of the recombinant EMAP- II after purification and cleavage by SDS-PAGE

- 1: EMAP- II after purification and cleavage by Factor Xa;
- 2: EMAP- II after purification; 3: Protein marker

### 2.3 重组 EMAP- II 介导人脐静脉内皮细胞 ECV-304 产生 TF 因子

TF 因子产生量用 Factor Xa 产生速率(ng/min)表示。由图 4 可见, 带标签 MBP 的重组蛋白和不带标签的重组蛋白均能使 ECV-304 细胞表达 TF 因子。在  $50 \sim 70 \text{ pmol}/\text{L}$  样品浓度下, TF 因子产生量最大, Factor Xa 产生速率约为  $1.7 \text{ ng}/\text{min}$ 。重组 EMAP- II 产生 TF 因子的能力与标准品 EMAP- II 不相上下。标签蛋白和热灭活重组蛋白均不能使 ECV-304 产生 TF 因子。

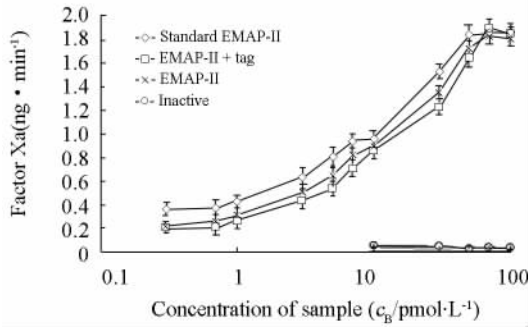


图4 重组 EMAP- II 介导 ECV-304 细胞表达 TF 因子  
 Fig. 4 Tissue factor production in ECV-304 cells induced by recombinant EMAP- II

2.4 重组 EMAP- II 增强 ECV-304 细胞对 TNF $\alpha$  致凋亡的敏感性

FCM 检测结果表明,用重组蛋白预处理的 ECV-304 细胞能够增强对于 TNF $\alpha$  介导凋亡的敏感性。4 个组的凋亡率分别为:对照组 (A 组)为( 5.2  $\pm$  0.8 )% ; TNF $\alpha$  组 (B 组)为( 16.6  $\pm$  2.5 )% ; EMAP- II 组 (C 组)为( 9.4  $\pm$  2.4 )% ; TNF $\alpha$  + EMAP- II 组 (D 组)为( 25.6  $\pm$  2.3 )% 。D 组较 B 组和 C 组有显著升高 ( $P < 0.01$ )。

2.5 重组 EMAP- II 对 SW1990 细胞增殖的抑制

图 6 显示胰腺癌 SW1990 细胞生长曲线,在 5、6、7 d,重组 EMAP- II ( 1  $\mu$ g/ml )作用组的 SW1990 细胞的增殖明显慢于对照组细胞 ( $P < 0.05$ )。

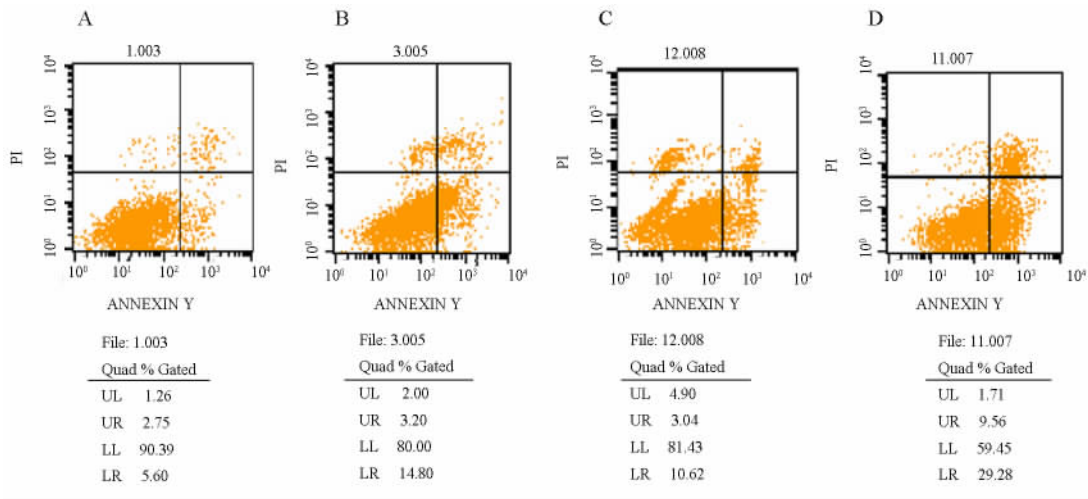


图5 重组 EMAP- II 增强 ECV-304 对 TNF $\alpha$  致凋亡的敏感性

Fig. 5 Enhancing effect of recombinant EMAP- II on TNF $\alpha$ -induced ECV-304 cells apoptosis

A:Control; B: 10 ng/ml TNF $\alpha$ ; C: 100ng/ml EMAP- II ; D: EMAP- II + TNF $\alpha$

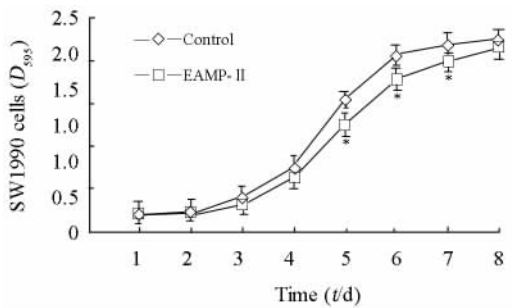


图6 重组 EMAP- II<sub>147-312</sub> 对 SW1990 细胞增殖的抑制  
 Fig. 6 Inhibitory effect of recombinant EMAP- II<sub>147-312</sub> on proliferation of SW1990 cells

\*  $P < 0.05$  vs control

3 讨论

自上世纪 90 年代 EMAP- II 被发现以来,该因子已被鉴定为具有非常广泛的生物学活性。在体动物实验发现,应用外源性 EMAP- II 腹腔注射,皮下神经胶质移植瘤的直径、重量均呈剂量依赖性缩小,生长速度明显减慢<sup>[8]</sup>;在肿瘤组织中,内、外源性的 EMAP- II 可抑制血管内皮细胞迁移、增殖和促进内皮细胞的凋亡,从而对肿瘤产生抗新生血管生成作用<sup>[5-6]</sup>;在人前列腺癌移植瘤模型中应用 EMAP- II 可使肿瘤的体积明显减小<sup>[11]</sup>。在 TNF $\alpha$  不敏感的软组织肉瘤鼠模型中,通过病毒感染的方法产生大量功能性 EMAP- II,使肿瘤对 TNF $\alpha$  发生敏感化<sup>[12]</sup>。在原发性眼色素层黑素瘤体中,施加 EMAP- II 可使巨噬细胞募集瘤体周围,使周围组织的微血

管破坏和瘤组织坏死速度加快<sup>[15]</sup>。以上事实表明,EMAP-Ⅱ能杀伤肿瘤内的新生血管并阻碍肿瘤的生长和转移,可提高某些抗癌药物的治疗效果,是一个比较有前途的抗肿瘤活性物质。

要对EMAP-Ⅱ开展抗肿瘤的研究及应用,其前提是制备具有良好生物学活性的重组EMAP-Ⅱ。虽然国外已经进行了重组EMAP-Ⅱ表达的研究,但对于重组产物抗肿瘤相关的活性报道得不多。因此,本课题选用pMAL-p2x表达系统对EMAP-Ⅱ进行重组表达并纯化。结果显示,重组EMAP-Ⅱ得率较高,平均每1g菌体(湿重)大约能得到500μg左右的纯化蛋白。重组蛋白纯度达电泳纯。

实验<sup>[2]</sup>证实,微量的天然EMAP-Ⅱ就可使培养的内皮细胞形成剂量依赖性的促凝血活动增加,这种促凝血活动增强加的一个重要指标是EMAP-Ⅱ可诱导内皮细胞表面产生组织因子(TF)。本研究结果显示,经纯化的重组EMAP-Ⅱ能以剂量依赖方式介导内皮细胞表面产生TF因子。研究<sup>[14]</sup>还表明,EMAP-Ⅱ能引起TNFRI及TRADD在内皮细胞表面及内部的重新分布,使原先对TNF $\alpha$ 不敏感的内皮细胞对TNF $\alpha$ 敏感性提高,该现象被认为是EMAP-Ⅱ提高TNF $\alpha$ 治疗实体瘤效果的可能机制。本研究同样显示,重组EMAP-Ⅱ提高内皮细胞对TNF $\alpha$ 致凋亡敏感性,而单用TNF $\alpha$ 或重组EMAP-Ⅱ均不能使ECV-304细胞发生明显凋亡。本研究还证实,应用较高浓度的重组EMAP-Ⅱ能够对人胰腺癌SW1990细胞的生长起到一定的抑制作用,而低浓度的重组蛋白未能产生相应的效果。

总之,本课题利用原核表达菌株*E. coli* BL21和pMAL-c2x原核表达系统重组表达人重组EMAP-Ⅱ蛋白具有良好生物活性,为进一步研究EMAP-Ⅱ的抗肿瘤作用奠定了一定的基础。

## [参考文献]

- [1] Kao J, Ryan J, Brett G, *et al.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor derived polypeptide that activates host-response mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(28): 20239-20247.
- [2] Berger AC, Tang G, Alexander HR, *et al.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived cytokine that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis[J]. *J Immunother*, 2000, 23(5): 519-527.
- [3] Quevillon S, Agou F, Robinson JC, *et al.* The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(51): 32573-32579.
- [4] Van Horsen R, Eggermont AM, ten Hagen TL, *et al.* Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho) physiological processes[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(5): 339-348.
- [5] Matschurat S, Knies UE, Person V, *et al.* Regulation of EMAP II by hypoxia[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(1): 93-103.
- [6] Murray JC, Symonds P, Ward W, *et al.* Colorectal cancer cells induce lymphocyte apoptosis by an endothelial monocyte-activating polypeptide-II-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 274-281.
- [7] Faisal W, Symonds P, Panjwani S, *et al.* Cell-surface associated p43/ endothelial-monocyte-activating-polypeptide-II in hepatocellular carcinoma cells induces apoptosis in T-lymphocytes[J]. *Asian J Surg*, 2007, 30(1): 13-22.
- [8] Schwarz RE, Schwarz MA. *In vivo* therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP-II[J]. *J Surg Res*, 2004, 120(1): 64-72.
- [9] Schwarz MA, Kandel J, Brett J, *et al.* Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells[J]. *J Exp Med*, 1999, 190(3): 341-353.
- [10] Wu PC, Alexander HR, Huang J, *et al.* *In vivo* sensitivity of human melanoma to tumor necrosis factor (TNF)-alpha is determined by tumor production of the novel cytokine endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAP II) [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 205-212.
- [11] Reznikov AG, Chaykovskaya LV, Polyakova LI, *et al.* Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model [J]. *Exp Oncol*, 2007, 29(4): 267-271.
- [12] Lans TE, ten Hagen TL, Van Horsen R, *et al.* Improved anti-tumor response to isolated limb perfusion with tumor necrosis factor after upregulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II in soft tissue sarcoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2002, 9(8): 812-819.
- [13] Tas MP, Houghton J, Jakobsen AM, *et al.* Cloning and expression of human endothelial-monocyte-activating polypeptide 2 (EMAP-2) and identification of its putative precursor[J]. *Cytokine*, 1997, 9(8): 535-539.
- [14] Van Horsen R, Rens JA, Schipper D, *et al.* EMAP-II facilitates TNF-R1 apoptotic signalling in endothelial cells and induces TRADD mobilization[J]. *Apoptosis*, 2006, 11(12): 2137-2145.
- [15] Clarijs R, Schalkwijk L, Ruiter DJ, *et al.* EMAP-II expression is associated with macrophage accumulation in primary uveal melanoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(5): 1801-1806.

[收稿日期] 2008-02-21

[修回日期] 2008-04-15

[本文编辑] 王莹