

表达血管抑制因子的腺相关病毒载体的构建及其体内外活性

刁勇¹, 马健², 李欣燕^{1,2}, 孙学英¹, 许瑞安^{1,2}

1 华侨大学分子药理学研究所, 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021

2 香港大学, 香港

摘要: 血管抑制因子(Vasostatin, VAS), 为集钙蛋白 N-末端 180 个氨基酸大小的蛋白, 是一种内源性血管生成抑制因子, 对多种肿瘤的生长具有很强的抑制作用。近期有研究显示, VAS 可以促进神经内分泌肿瘤的恶化, 提醒研究人员在开发该抗肿瘤药物时必须非常谨慎。将 VAS cDNA 插入腺相关病毒-2 表达质粒 pAAV-2, 采用无辅助病毒参与的三质粒共转染法制备 rAAV-VAS 病毒。体外分别转染小鼠胰内皮细胞 MS1 和结肠癌细胞 HCT-116, MTT 法测定对细胞生长的影响, Western blotting 方法检测 VAS 的表达。采用小鼠皮下移植瘤模型, 验证 VAS 的表达对肿瘤生长、新生血管密度、以及细胞增殖的作用。结果证明构建的 rAAV-VAS 病毒载体, 能抑制小鼠胰内皮细胞的生长, 转染 HCT-116 后能有效表达 VAS 蛋白, 但 HCT-116 的体外生长不受影响。瘤体注射 rAAV-VAS 后, HCT-116 移植瘤在小鼠体内的生长速度明显减缓, 肿瘤新生血管密度明显降低。结果显示, rAAV-VAS 可以抑制 HCT-116 移植瘤的新生血管形成, 但对其细胞增殖无明显作用。

关键词: 血管抑制因子, 结肠肿瘤, 血管生成, 基因药物, 腺相关病毒

Construction and Activity of Recombinant Adeno-associated Virus Expressing Vasostatin

Yong Diao¹, Jian Ma², Xinyan Li^{1,2}, Xueying Sun¹, and Ruian Xu¹

1 Molecular Medicine Engineering Research Center of the Ministry of Education, and Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China

2 Hong Kong University, Hong Kong, China

Abstract: Vasostatin, a 180-amino acid fragment from the N-terminal domain of calreticulin, is a potent endogenous angiogenesis inhibitor, which can inhibit the growth of many kinds of experimental tumor. But a recent report that vasostatin can enhance the malignant behavior of neuroendocrine tumor reminds us to be cautious to develop it as an anti-tumor medicine. VAS cDNA was cloned into pAAV-2 expression vector; recombinant virus rAAV-VAS was generated by a three plasmids, helper free packaging method. MS1 mouse pancreatic endothelial cell and human colon tumor HCT-116 cell were infected with rAAV-VAS. Transgene expression was analyzed by Western blotting analysis; cell proliferation was determined by MTT assay. The therapeutic potential of rAAV-VAS was evaluated in subcutaneous HCT-116 xenograft mouse model. rAAV-VAS inhibited the proliferation of MS1 but not

Received: May 27, 2008; **Accepted:** July 14, 2008

Supported by: the National High-tech Research and Development Programs of China (863 program) (No. 2007AA02Z194), the Hong Kong University Foundation (special donation from Madame Cho So Man) and Huaqiao University Foundation (No. B105).

Corresponding author: Yong Diao. Tel: +86-595-22692516; E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(“863 计划”, No. 2007AA02Z194), 香港大学基金(Madame Cho So Man 捐赠), 华侨大学基金(No. B105)资助。

HCT-116 cell. HCT-116 cell infected with rAAV-VAS secreted VAS protein into the supernatant effectively. The intratumoral delivery of rAAV-VAS inhibited the xenograft growth and microvessel density in tumors significantly. Our results show the effectiveness of rAAV-VAS as an angiogenesis inhibitor in suppressing tumor growth, validating the application of rAAV-VAS gene therapy in treatment against colon cancer.

Keywords: vasostatin, colorectal neoplasms, angiogenesis, gene medicine, adeno-associated virus

血管抑制因子(Vasostatin, VAS)是长度为180个氨基酸的人集钙蛋白N-末端蛋白片段。Pike首先发现VAS可以抑制bFGF诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和胎牛心内皮细胞(FBHE)的生长^[1,2]。之后陆续有研究表明VAS还可以抑制牛动脉内皮细胞(BAEC)和小鼠淋巴结内皮细胞(SVEC4-10)等内皮细胞的生长,是一种内源性血管生成抑制因子^[3,4]。

肿瘤血管生成已成为一个崭新的、有希望的抗肿瘤治疗靶点。针对肿瘤血管生成而进行的新药研究已取得了突破性进展,70多种抗肿瘤新生血管生成的药物正在临床研究中,有的甚至已批准正式生产。数项动物实验证明,VAS能够抑制多种肿瘤的生长,如Burkitt淋巴瘤(CA46)、结肠腺瘤(SW480)、胰腺癌等^[3,4],采用的给药方法包括重组VAS蛋白肌肉注射、质粒或腺病毒介导的基因治疗等^[1,3,4]。VAS对肿瘤的有效性激发了研究人员的开发热情,但近期一项研究显示,VAS基因经FuGene 6转染试剂转染来源于人胰腺癌淋巴结转移瘤的BON细胞后,不但不能抑制该神经内分泌肿瘤的生长,反而促进了其恶化^[5],提醒我们该抗肿瘤药物的开发前景并不盲目乐观。虽然本实验研究人员认为VAS对肿瘤的作用也许因瘤而异,但我们认为给药方式、载体类型可能是主要因素。

腺相关病毒(AAV)细胞宿主范围广、对人无致病性、免疫原性小^[6]。基于AAV开发的重组AAV载体(rAAV),因具有独特的优点,越来越多地应用于基因治疗研究。本实验利用rAAV2载体系统,制备携带人VAS cDNA的rAAV病毒,经体内外多种手段研究了该rAAV病毒的作用特点及可能的作用机制,为进一步开发治疗结肠癌的rAAV-VAS基因药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和动物

包装细胞 HEK293, 结肠腺瘤细胞系 HCT-116,

小鼠胰腺内皮细胞 MS1 购自美国 ATCC。BALB/c 裸鼠购自香港大学动物中心。

1.2 主要试剂

腺相关病毒表达质粒 pAAV-2, 包装辅助质粒 pH22 和 pFd6 保存于华侨大学分子药物研究所。限制性内切酶, T4连接酶为 TaKaRa公司产品。抗CD34抗体, 抗Ki-67抗体购自 Santa Cruz公司, 抗人集钙蛋白抗体购自 Stressgen公司, HRP标记二抗和化学发光试剂购自 Amersham Pharmacia公司。胎牛血清及新生牛血清, DMEM培养基购自 Gibco公司。

1.3 PCR引物

PCR所用的引物及序列见表1。

表1 PCR扩增所用的引物及其序列
Table 1 PCR primers and sequences

Primer	Sequence (5'-3')
VAS-F	AACTCGAGCCCCGCCATGCTGCTATCC
VAS-R	AAAAGCTTCTAGTTGTCTGGCCGCACAAT
WPRE-F	TGGCGTGGTGTGCACTGT
WPRE-R	GTTCCGCCGTGGCAATAG

1.4 目的基因的扩增及 pAAV-VAS 质粒的构建

以人肝第1链cDNA文库为模板, PCR扩增人VAS全长cDNA。上游引物VAS-F引入Xho I位点, 下游引物VAS-R引入Hind III位点。扩增条件: 94°C变性1 min, 然后94°C、50°C、68°C各45 s, 共36个循环, 最后68°C延伸5 min。将PCR产物插入pGEM-T载体, 转化感受态菌DH5 α , 提取质粒, DNA测序正确后, 以Xho I及Hind III双酶切, 回收目的片段, 插入pAAV-2质粒的相同位点, 以连接产物转化DH5 α 感受态菌, 提取质粒pAAV-VAS, 酶切鉴定。

1.5 rAAV-VAS 的包装和纯化

将 4×10^6 个HEK 293细胞接种于细胞培养皿(150 mm \times 20 mm), DMEM培养基培养2 d, 至70%~80%汇合度。在转染前2 h~3 h, 更换为IMDM

培养基。取 2.5 mL 含 12.5 μg pAAV-VAS、12.5 μg pH22 和 25 μg pFd6 质粒的 300 mmol/L CaCl_2 溶液, 与 $2 \times \text{HEPES}$ 溶液混合, 加入细胞培养皿中, 混匀, 培养 16 h。更换培养基为 DMDM, 继续培养 2 d, 收获细胞。

将细胞重悬于结合溶液, 10 mL/平皿。加入去氧胆酸(0.5%)和 benzonase (30 u/mL), 37°C 孵育 30 min。离心除细胞碎片, -80°C 冷冻。

取细胞裂解液化冻, 离心, 0.45 μm 过滤, 经 HiTrap 肝素柱纯化, 得到纯化病毒液 rAAV-VAS, 分装后 -70°C 冻存备用。

1.6 重组病毒 rAAV-VAS 的滴度测定

先用 DNase 处理病毒液 rAAV-VAS, 以除去未包装的 rAAV 基因组。加入等体积蛋白酶 K 溶液, 37°C 孵育 60 min。酚-氯仿法纯化病毒 DNA, 乙醇沉淀。病毒 DNA 用去离子水溶解, real-time PCR 法测定 rAAV-VAS 的滴度($\mu\text{g}/\text{mL}$)。PCR 引物为 WPRE-F 和 WPRE-R。标准曲线由已知浓度的 pAAV-VAS 制备。

1.7 重组病毒 rAAV-VAS 对细胞的生长抑制

取生长状态良好的 MS1 或 HCT-116 细胞, 按 2000 个/孔接种到 96 孔板中, 培养 2 d 后, 加入 rAAV-VAS 或对照 rAAV-GFP(MOI, 10^4), 5 h 后换为正常培养基。连续培养, 每天换液。每天各取 4 孔, 分别加入 MTT 溶液, 37°C 孵育 4 h, 吸去上清培养液终止培养。每孔加入 150 μL 酸化异丙醇, 轻微振荡, 使结晶物充分溶解。以 570 nm 为测定波长, 以 690 nm 为参比波长测定各孔光吸收值。相对细胞活力按照实验组 OD 值/对照组 OD 值计算。

1.8 重组病毒 rAAV-VAS 在 HCT-116 细胞中的表达检测

取生长状态良好的 HCT-116 细胞, 按 5×10^4 个/孔接种到 24 孔板中, 培养 2 d 后, 加入 rAAV-VAS 或对照 rAAV-GFP, 5 h 后换为正常培养基。72 h 后, 收集细胞上清。用胰酶/EDTA 溶液消化细胞, 离心收集细胞, 用 RIPA 溶液裂解细胞, 离心除细胞碎片。细胞上清和裂解液经浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳, Western blotting 法检测 VAS 的表达。

采用不同感染复数(MOI) 的重组病毒 rAAV-VAS 感染 HCT-116 细胞, 同法收集细胞上清, Western blotting 法检测 VAS 的表达水平。

1.9 重组病毒 rAAV-VAS 对 HCT-116 皮下移植瘤的生长抑制

取 7 周龄雄性 BALB/c 裸鼠 10 只, 随机分成 2 组, 每组 5 只, 麻醉后背侧部分别接种 HCT-116 细胞, 接种量为 2×10^6 个细胞, 细胞悬浮于 100 μL PBS 中。接种 7 d 后, 瘤体注射 rAAV-VAS 或对照 rAAV-GFP, 剂量为 2×10^{11} vg/鼠。定期观察并测定肿瘤体积, 肿瘤体积 = $0.52 \times a \times b^2$, a 和 b 分别为肿瘤的长径和短径。

1.10 移植瘤免疫组织化学检测

肿瘤切除后甲醛固定, 石蜡包埋后进行组织切片(5 μm)。免疫组织化学检测使用的一抗为 CD34 和 Ki-67 抗体, 分别检测微血管密度和细胞增殖。

在高倍镜下计数微血管数目, 视野面积为 0.7386 mm^2 。每个移植瘤切片取 3 个视野, 其平均值为平均微血管密度(MVD)。在显微镜下随机选择 10 个视野, 计数 Ki-67 阳性细胞, 并计算增值指数。

1.11 体内移植瘤细胞的转基因表达

按照 Trizol 试剂盒说明书方法提取瘤细胞的总 RNA, 通过 RT-PCR 测定 VAS 的 mRNA 表达。引物分别采用 VAS-F 和 WPRE-R, 以避免非特异性干扰。PCR 条件为 94°C、55°C 和 72°C 各 45 s, 共 32 个循环。以 18S rRNA 为参比。

2 结果

2.1 pAAV-VAS 质粒的构建

所构建的 pAAV-VAS 质粒的表达框见图 1。其中启动子为由 CMV 增强子和鸡 β -actin 启动子组成的 CAG, VAS cDNA 之后为转录后调节元件 WPRE, 表达框两端为 AAV-2 的反向末端重复系列 ITR。

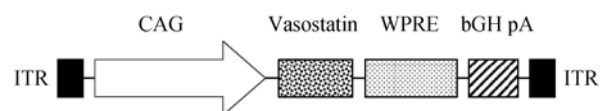


图 1 pAAV-VAS 质粒的表达框

Fig. 1 Schematic representation of pAAV-VAS expression cassette

2.2 重组病毒 rAAV-VAS 的滴度

采用上述无辅助病毒参与的三质粒共转染法制备的重组病毒 rAAV-VAS 的滴度为 $1.5 \times 10^{11} \sim 3.5 \times 10^{11}$ $\mu\text{g}/\text{平皿}$ 。

2.3 重组病毒 rAAV-VAS 对 MS1 细胞的生长抑制

重组病毒 rAAV-VAS 明显抑制 MS1 细胞的增殖(图 2), 在感染第 2 天时, 相对细胞活力已降低为 rAAV-GFP 对照组的 80% ($P < 0.05$), 第 3 天时则降至 60% 左右 ($P < 0.01$), 细胞出现明显的变圆和脱落现象, 而对照组则无明显变化。

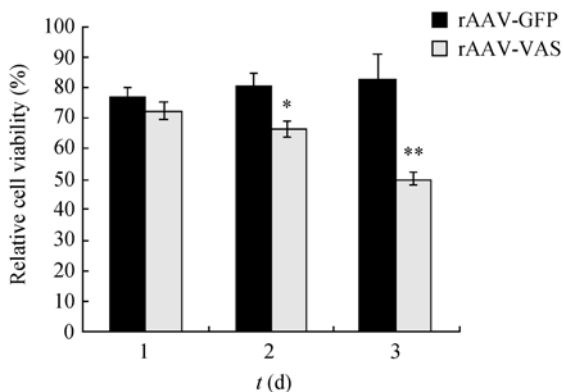


图 2 MS1 细胞在感染 rAAV-VAS 后的相对细胞活力
Fig. 2 Relative cell viability of MS1 cells infected with rAAV-VAS

* $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control

2.4 重组病毒 rAAV-VAS 对 HCT-116 细胞的生长影响

和对照 rAAV-GFP 类似, 重组病毒 rAAV-VAS 对 HCT-116 的生长无明显影响(图 3)。

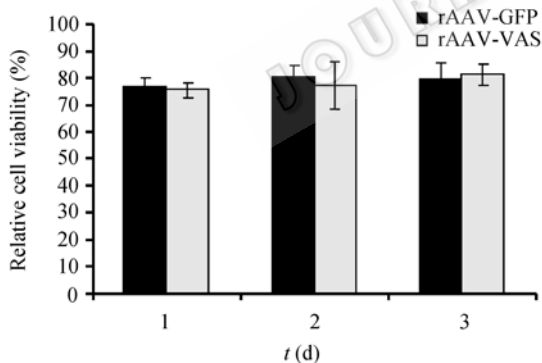


图 3 HCT-116 细胞在感染 rAAV-VAS 后的相对细胞活力
Fig. 3 Relative cell viability of HCT-116 cells infected with rAAV-VAS

2.5 重组病毒 rAAV-VAS 在 HCT-116 细胞中的表达检测

在 HCT-116 细胞培养上清和裂解液中, 均检出 22 kD 大小的蛋白条带, 与 VAS 蛋白的分子量一致(图 4)。结果说明 rAAV-VAS 可以成功转导 HCT-116 细胞, 转基因可以分泌蛋白的形式分泌。

以不同感染指数 (MOI) 的重组病毒感染 HCT-116 细胞, 所得到细胞上清中的转基因表达呈明显的量效关系(图 5)。

2.6 重组病毒 rAAV-VAS 对 HCT-116 皮下移植瘤的生长抑制

裸鼠皮下接种 HCT-116 细胞 7 d 时, 肿瘤大小约为 50 mm³。瘤体注射重组病毒 rAAV-VAS 后, 给药组肿瘤生长速率小于对照组, 肿瘤体积经时曲线见图 6。在 50 d 后, 两组肿瘤体积大小有显著性差异 ($P < 0.05$)。



图 4 Western blotting 法检测 rAAV-VAS 感染 HCT-116 细胞的 VAS 蛋白表达

Fig. 4 Western blotting analysis of Vasostatin expression in rAAV-VAS infected HCT-116 cells
1: cell medium; 2: cell lysate



图 5 rAAV-VAS 感染复数对 VAS 蛋白表达水平的影响
Fig. 5 Western blotting analysis of Vasostatin expression level with different rAAV-VAS

1: MOI=0; 2: MOI=10; 3: MOI=10²; 4: MOI=10³; 5: MOI=10⁴

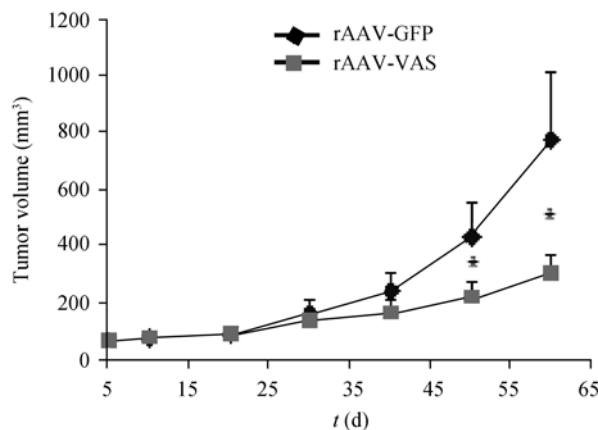


图 6 重组病毒 rAAV-VAS 对 HCT-116 皮下移植瘤的生长抑制

Fig. 6 Suppression of subcutaneous tumor growth by rAAV-VAS intratumoral injection
* $P < 0.05$ vs control

2.7 重组病毒 rAAV-VAS 对移植瘤新生血管的生长抑制

皮下移植瘤切片 CD34 免疫组化染色结果(图 7)

显示, 对照组瘤组织新生血管丰富, 其平均微血管密度(MVD)为 243 ± 78 /单位面积。而 rAAV-VAS 治疗组 MVD 仅为 74 ± 28 /单位面积, 显著低于对照组 ($P < 0.01$)。结果表明 rAAV-VAS 可有效降低 HCT-116 皮下移植瘤内新生血管的生成, 因而限制了肿瘤的血供, 抑制其生长速率。

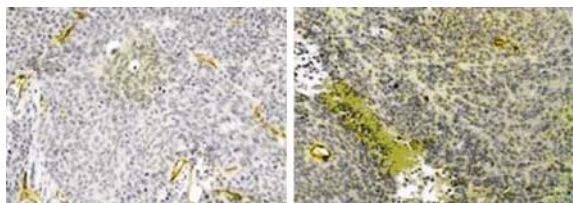


图 7 重组病毒 rAAV-VAS 对移植瘤新生血管的生长抑制

Fig. 7 Inhibition of tumor angiogenesis

Sections of subcutaneous HCT-116 tumors from mice intratumorally injected with rAAV-GFP (left) and rAAV-VAS (right) 2 months after treatment were immunostained with anti-CD34 Ab. Representative photographs were shown

2.8 重组病毒 rAAV-VAS 对移植瘤细胞增殖的影响

皮下移植瘤切片 Ki-67 免疫组化染色后, 计算增殖指数(图 8)。重组病毒 rAAV-VAS 治疗组 HCT-116 细胞增殖指数略微下降, 但与对照组无明显差异。说明 rAAV-VAS 并不能影响 HCT-116 细胞在体内的增殖, 体内外结果相一致。治疗组增殖指数的减少, 可能与移植瘤血液供应降低有关。

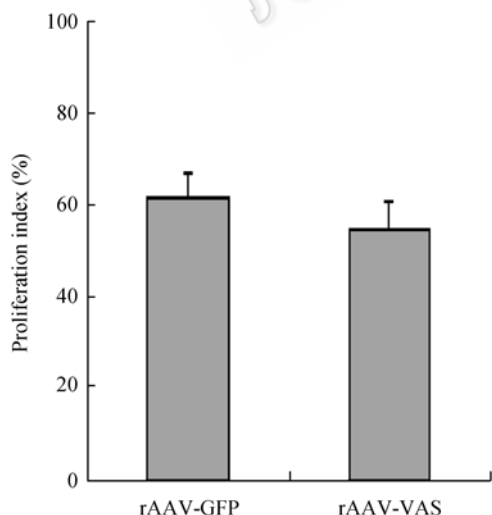


图 8 rAAV-VAS 对 HCT-116 移植瘤细胞增殖指数的影响

Fig. 8 Proliferation index of HCT-116 cells treated with rAAV-VAS

2.9 移植瘤细胞内转基因的表达

小鼠处死后, 取移植瘤组织 RT-PCR 法检测转基因的表达(图 9), 治疗组可见明显的 VAS mRNA 的表达。RT-PCR 采用的上游引物对应于 VAS 基因, 下游引物对应于 WPRE 元件, 因此可以有效避免非特异性反应。

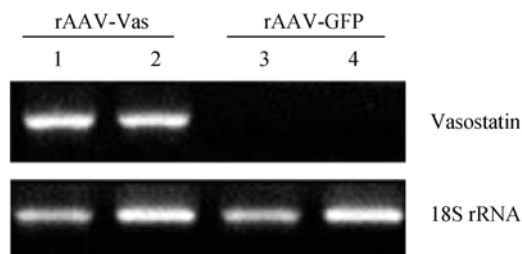


图 9 RT-PCR 法检测移植瘤组织内 VAS 转基因的表达

Fig. 9 Specific rAAV-mediated transgene expression detected by RT-PCR in HCT-116 tumor from BALB/c nude mice

Two months after treatment with rAAV-VAS (lanes 1 and 2) or rAAV-GFP (lanes 3 and 4) 18S rRNA was amplified as a PCR internal control

3 讨论

以上实验结果表明, 重组病毒 rAAV-VAS 在体外能够抑制内皮细胞的增殖, 在体内抑制肿瘤新生血管的生成, 降低肿瘤的血供, 从而实现抑制肿瘤生长的目的。体内外实验均说明重组病毒 rAAV-VAS 对于结肠癌 HCT-116 细胞的生长无直接的抑制作用, 但重组病毒 rAAV-VAS 感染 HCT-116 细胞后, 可以有效表达转基因蛋白, 并以分泌蛋白的形式产生, 表达量与感染复数 MOI 呈量效关系。在瘤体注射 rAAV-VAS 的 2 个月实验期内, 转基因可以稳定表达。

大部分有关 VAS 的研究都显示, 无论以蛋白形式, 还是以基因治疗方式, VAS 均可以抑制内皮细胞的增殖, 并在动物荷瘤模型证实了其抑制肿瘤生长的疗效。本实验采用的 HCT-116 细胞, 具有很强的 VEGF 和 bFGF 分泌能力, 该细胞引起肿瘤发生和发展的过程, 与 VEGF 和 bFGF 诱导的血管生成密切相关^[7]。VAS 的作用特点, 恰恰是阻断了 VEGF 和 bFGF 诱导的血管生成事件^[1,2], 本研所得到的结果与 VAS 的作用机理相符合。

但 Liu 等有关 VAS 促进神经内分泌瘤恶化的研究, 引起我们高度的注意^[5]。Liu 对其实验结果的分

析是神经内分泌瘤可能与其他肿瘤的发生机制不同,血管生成也许不是其生长的主要因素。

由此推测, Liu 等采用的基因传递方式也许是产生其报道结果的重要原因。Liu 等使用一种非脂质体型转染试剂 FuGENE 6, 将表达质粒直接转入神经内分泌瘤 BON 细胞中, 通过间接体内法研究 VAS 对移植瘤的作用。从其结果可以发现, 空载体 FuGENE 6 转染的 BON 细胞, 成瘤性以及瘤生长速度也明显超过 BON 细胞本身。另外, 转染后的 BON 细胞表达 VAS 的效率和稳定性也未报道。所以基因载体选择不合适, 目的基因表达的效率及稳定性, 都可能影响对肿瘤的疗效。Xiao 等也是采用质粒为载体, 每周 2 次连续 4 周肌肉注射, 可以抑制肿瘤的生长^[3]。Li 等则使用了腺病毒载体^[4]。

rAAV 载体因具有能长期稳定表达外源基因、安全性高等优点, 被认为是最适合长期应用的基因治疗载体。本研究证明 rAAV-2 载体能有效介导转基因在目标细胞 HCT-116 的表达和分泌, 并且存在明显的剂量效应关系。经 rAAV-2 载体介导的 VAS 基因在体内的稳定表达, 可抑制结肠癌的生长, 为开发新的肿瘤治疗药物奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Pike SE, Yao L, Jones KD, *et al.* Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med*, 1998, **188**(12): 2349–2356.
- [2] Pike SE, Yao L, Setsuda J, *et al.* Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood*, 1999, **94**(7): 2461–2468.
- [3] Xiao F, Wei Y, Yang L, *et al.* A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin. *Gene Ther*, 2002, **9**(18): 1207–1213.
- [4] Li L, Yuan YZ, Lu J, *et al.* Treatment of pancreatic carcinoma by adenoviral mediated gene transfer of vasostatin in mice. *Gut*, 2006, **55**(2): 259–265.
- [5] Liu MH, Imam H, Oberg K, *et al.* Gene transfer of Vasostatin, a calreticulin fragment, into neuroendocrine tumor cells results in enhanced malignant behavior. *Neuroendocrinology*, 2005, **82**(1): 1–10.
- [6] Li HM, Qiu W, Wang F, *et al.* Construction and expression of recombinant adeno-associated virus expressing brain-derived neurotrophic factor. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(2): 328–332.
李惠明, 裘玮, 王丰, 等. 表达分泌型脑源性神经营养因子的腺相关病毒载体的构建及其表达的检测. *生物工程学报*, 2008, **24**(2): 328–332.
- [7] Okada F, Rakj J, Croix BT, *et al.* Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: Mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(7): 3609–3614.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

生物催化剂与酶工程 (译)

Biocatalysts and Enzyme Technology

〔德〕K 布赫霍尔茨 V 卡谢 UT 博恩舒尔等编著
魏东芝 马昱澍 马兴元等译

978-7-03-022195-7 ¥65.00 2008年9月出版

生物催化剂和酶工程是生物工程的重要研究和应用领域, 本书将为读者带来人类应用生物催化剂的历史, 酶的催化原理、动力学、产量、循环、特性以及设计方法等知识。不仅涵盖了常用的可溶性酶, 也着重介绍了新式的固定化酶在有机合成、生物反应器设计和反应工程中的应用。每一章都有大量的应用实例, 章末还设有习题以帮助读者更好地学习这门令人兴奋的学科。

本书适合于生物化学、生物催化工程、发酵生产等领域的研究者和技术人员使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>