

rhEGF 转基因迷你番茄研究

Studies of rhEGF Transgenic Mini- tomato

智庆文/ZHI Qing-wen^{1,2,4}, 张凤英/ZHANG Feng-ying⁴, 柴敏/CHAI Min³, 李仕贵/LI Shi-gui², 孙曼霁/SUN Man-ji¹

1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850
2. 四川农业大学水稻研究所, 成都 611130
3. 北京市农林科学院蔬菜研究所, 北京 100089
4. 中国人民解放军防化指挥工程学院, 北京 102205

1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
2. Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China
3. Institute of Vegetable, Beijing Academy of Agriculture and Forest, Beijing 100089, China
4. Command and Engineering College of Chemical Defense of Chinese PLA, Beijing 102205, China

[摘要] 为了使表皮生长因子(hEGF)基因在番茄中表达, 构建了 hEGF 基因的表达载体 p2300-2A11-hEGF, 通过电激法转化到农杆菌菌株 C58 中, 采用叶盘法转化番茄品系 cg2002-14。子叶经发芽及生根诱导培养后得到了再生植株。PCR 分析表明, hEGF 基因已整合到番茄的基因组中。放射免疫法(RIA)测得重组人表皮生长因子(rhEGF)在鲜重果实中平均含量为 3.85 ± 0.86 ng/g, 对酒精引起的小鼠急性胃溃疡有明显的预防作用, 溃疡指数由 52.20 ± 3.24 降至 21.20 ± 6.84 , 抑制率达 59.39%。

[关键词] 转基因迷你番茄; 人表皮生长因子; 胃溃疡; 酒

[中图分类号] Q943.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)11-0019-04

收稿日期: 2006-09-20

作者简介: 智庆文, 男, 中国人民解放军防化指挥工程学院, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学; E-mail: zhiqw6988@tom.com
孙曼霁(通讯作者), 男, 中国科学院院士, 军事医学科学院毒物药物研究所, 研究员, 主要研究方向为基因工程药物;
E-mail: sunmj@nic.bni.ac.cn

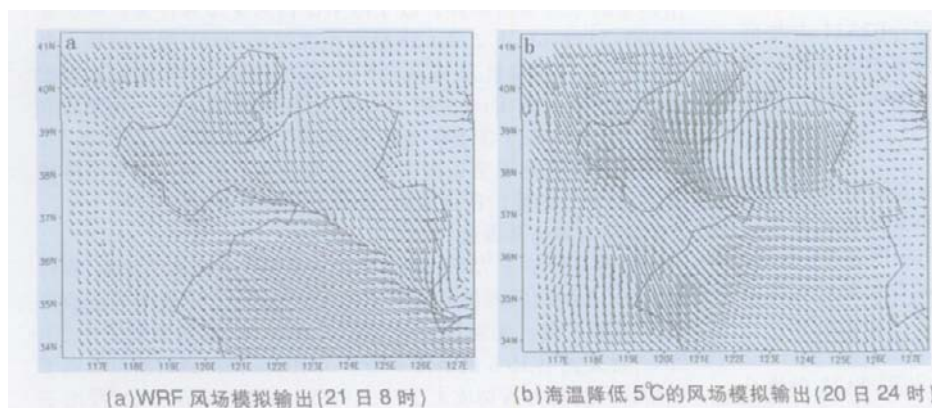


图6 2005年12月21日10m风场模拟

Fig. 6 WRF outputs of wind field at 10 m height on 21st December, 2005

面层内产生的陆风辐合带是导致降雪增幅的主要原因, 对确定暴雪落区起着重要作用。同时, 海岸线与周围地形对这次降雪也有很大贡献。

2) 在分析威海冬季暴雪的天气变化时, 不仅要重视整个大气环流对本地区的影响, 同时更要重视中小尺度系统的影响, 特别是海陆风对沿海地区的天气有明显加

强(或削弱)的作用, 是局地临近预报需要考虑的项目。

3) 应用多普勒天气雷达 PPI 图与红外卫星云图资料, 可对产生中尺度海岸锋生成的对流云团的移动路径和降雪落区进行跟踪观测, 在短时临近预警中具有指示意义。

参考文献(References)

- [1] 李洪业, 徐旭然. 冷流低云降雪成因分析[J]. 气象, 1995, 21(12): 21-24.
- [2] 郑丽娜, 石少英, 侯淑梅. 渤海的特殊地形对冬季冷流降雪的贡献[J]. 气象, 2003, 29(1): 49-52.
- [3] 周淑玲, 闫淑莲. 威海市冬季暴雪的天气气候特征[J]. 气象科技, 2003, 31(3): 183-185.
- [4] 陆汉城, 杨国祥. 中尺度天气原理和预报(第二版)[M]. 北京: 气象出版社, 2004.
- [5] 曹钢锋, 张善君, 朱官忠, 等. 山东天气分析与预报[M]. 北京: 气象出版社, 1988.

(责任编辑 王芷)

Abstract: To produce human epidermal growth factor (hEGF) in transgenic mini- tomatoes, plasmids p2300- 2A11- hEGF carrying the hEGF gene were constructed and transformed via eletro- perforation to *Agrobacterium* C58, and then transfected to tomatoes cg2001- 14 via leaf disk transformation. The regenerated plantlets were obtained from the cotyledons after shoot and root inducing cultivations. The PCR analysis showed that the hEGF gene has been integrated into the mini- tomato genome. Radioimmunoassay (RIA) showed that the mean yield of rhEGF in the fresh fruits of the transgenic mini- tomatoes amounted to 3.85 ± 0.86 ng /g fruit. Ingestion via gastric intubation of the transgenic mini- tomato juice significantly protected the mice from the alcohol- induced acute peptic ulceration. The ulcer index, expressed as a degree of the stomach lesion, decreased from 52.20 ± 3.24 to 21.20 ± 6.84 , and the inhibition rate got to 59.39%.

Key Words: transgenic mini- tomato; human epidermal growth factor; peptic ulcer; alcohol

CLC Number: Q943.2

Document Code: A

Article ID: 1000- 7857(2006)11- 0019- 04

1 引言

人 EGF 是含 53 个氨基酸残基的小分子多肽,有多种生物学功能,极微量的 EGF 即可促进表皮细胞等多种细胞的生长^[1],临床上已应用于烧伤^[2]、创伤^[3]和消化道溃疡的治疗^[4-5]。人 EGF 由颌下腺分泌,经唾液吞咽至消化道,在保护口腔、食道、胃及十二指肠粘膜的完好性中发挥着重要的生理作用。EGF 分泌不足时,容易导致一系列的病理变化,很多证据表明,胃溃疡患者的体液中 hEGF 含量明显降低^[6-7]。药用 hEGF 都是在微生物中表达的,其纯化和复性比较复杂^[8-9],成本较高,限制了其在临床及其他领域的广泛应用。近年来,由于对番茄植物生物反应器的深入研究,一些有价值的基因工程药物得以成功表达^[10-12]。利用番茄作为生物反应器生产植物疫苗和生物药物,正在成为番茄基因工程研究的热点之一。利用转基因番茄生产人胰岛素,在预防 I 型糖尿病中已取得很大进展^[10]。将乙型肝炎病毒的表面抗原基因导入番茄,也成功地获得了转基因抗乙肝番茄,饲喂小白鼠,获得了对乙肝的免疫能力^[12]。用转基因番茄表达人酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)也获得成功^[11]。用番茄作为生物反应器生产药物或疫苗有其独特的优点,番茄果实味道鲜美,可以生吃,不破坏药效,且服用方便。本研究以果实为特异性表达载体,生产人 EGF 转基因迷你番茄作为饮酒前的保健食品及预防和治疗消化道溃疡的药用水果。

2 材料与方法

2.1 番茄品系

cg2001- 14 为迷你番茄自交系,由北京市农林科学院蔬菜研究中心柴敏研究员提供。

2.2 质粒与菌株

p2300- 35S- hEGF 由本实验室构建并保存;pB2A11 由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室林忠平教授惠赠;pGEM T 载体为 Promega 公司产品;Agrobacterium C58,由本实验室保存。

2.3 工具酶和试剂

限制性内切酶 BamH I、Hind III 及 T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及 DNA markers、植物基因组 DNA 提取试剂盒、Taq PCR MasterMix 均为北京天为时代科技有限公司产品;人 EGF 放射免疫试剂盒为北方生物技术研究中心产品。

2.4 p2300- 2A11- hEGF 表达载体的构建

2A11 启动子是番茄果实特异表达启动子。依据 2A11 启动子的序列设计合成一对扩增引物,上游:5'-TTAAGCTTAG-CACTTGTTAGACTCATCTG-3',划线部分为 HindIII 酶切位点;下游:5'-TTGGATCCAATGGTTTGGATTAAATTGC-3',划线部分为 BamHI 酶切位点。以质粒 pB2A11 为模板,扩增出两端分别含有 HindIII 和 BamHI 酶切位点的 2A11 启动子片段,将该片段连接到 pGEM T 载体上,构成一中间载体 pGEM- 2A11。然后用 HindIII 和 BamHI 分别酶切 pGEM- 2A11 和 p2300- 35S- hEGF,回收 2A11 启动子片段和 p2300 载体部分,将它们连接即得到表达

载体 p2300- 2A11- hEGF (图 1)。将构建好的表达载体 p2300- 2A11- hEGF 通过酶切及测序验证其正确性,该表达载体的大小约 10kb。

2.5 C58/p2300- 2A11- hEGF 工程菌的获得

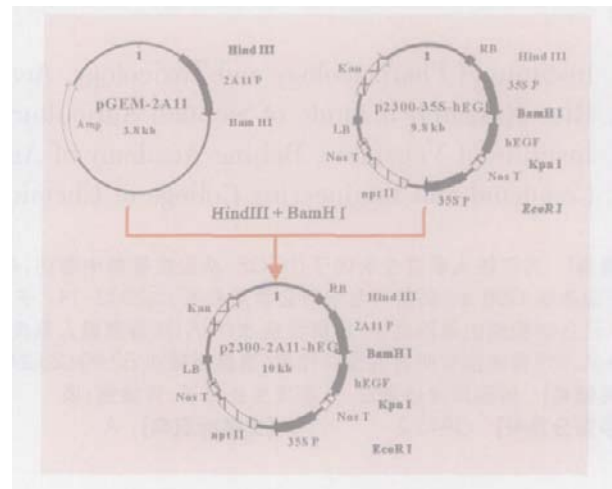


图 1 p2300- 2A11- hEGF 表达载体的构建

Fig. 1 The construction of p2300- 2A11- hEGF expression vector

将 C58 农杆菌于 YEB 培养基中培养至 $OD_{600}=1.0$ 左右,于灭菌的 1.5 ml Eppendorf 管中收集菌体,无菌去离子水冲洗 2 次,用挂壁的水分重悬菌体,放于冰中即得感受态农杆菌。取质粒 p2300- 2A11- hEGF 2 μ l, C58 感受态农杆菌 30 μ l,混匀后转入电激杯中。电转化参数为:电压 2.5 kv,电容 25 μ f,电阻 300 Ω 。电激后的菌体中加入 1 ml 去离子水或 YEB 液体培养基,混匀后取 100~200 μ l 涂布于含 100 ng/L Kam 的 YEB 固体平板培养基上。于 28 $^{\circ}$ C,倒置培养至长出大量的克隆菌斑,挑取几个单菌落培养,提质粒分析鉴定所得菌体,检测无误即为可用工程菌。

2.6 番茄的转化及再生

将番茄种子于 75%的酒精中浸泡 1 min 进行表面消毒,然后浸泡于 1%的次氯酸钠溶液中消毒 15~30 min。用灭菌的蒸馏水充分洗涤 3 次。无菌滤纸吸干,接种于 MS 基本培养基中,于 25 $^{\circ}$ C,每天光照 16 h 的条件下培养 7~10 d。将得到的新鲜幼嫩子叶用锋利的剪刀剪切成大小约为 0.25 cm $\times$ 0.5 cm 的方块,浸泡于活化的农杆菌中;15 min 后,无菌滤纸吸去多余液体,接种于共培养培养基中(1 L MS 基本培养基添加:1 ng 的 IAA,1 ng 的 6-BA,2 ng 的 ZT 以及 100 ng 的 Kam),28 $^{\circ}$ C 暗培养 2 d。共培养后的外植体转移到筛选及分化培养基上,(1 L 共培养培养基添加 500 ng 的 Cerb),25 $^{\circ}$ C,光照 16 h/d 培养,每 2 周更换 1 次培养基,直至长出分化苗。待分化出的抗性苗长到 1 cm 左右时,用锋利的刀片切下小苗,转移到生根培养基中诱导生根(1 L 基本培养基添加:IBA0.5 ng, Kam50 ng, Cerb 300 ng),待根系发育

良好, 逐渐打开培养瓶上封口膜, 使其适应外界环境, 然后移栽至盛有草炭灰和蛭石(3:1)的塑料育苗钵中。

2.7 再生植株的分子检测

对于所得到的抗性植株, 取其叶片提取基因组 DNA 进行 PCR 分析, rhEGF 基因的扩增引物: 上游: 5'-CGG ATC CAT GAA TAG CGA TTC TGA A-3'; 下游: 5'-AGG TAC CTC ATT AAC GAA GTT CCC ACC A-3'。2A11 启动子的扩增引物是: 上游: 5'-TTA AGC TTA GCA CTT GTT AGA CTC ATC TG-3'; 下游: 5'-TTG GAT CCA ATG GTT TTG GAT TAA TTG C-3'。PCR 反应程序: 94℃预变性 5 min, 然后 94℃变性 30 s, 65℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个反应循环结束后, 72℃继续延伸 7 min。PCR 反应产物于 2%的琼脂糖凝胶中电泳检测。

2.8 迷你番茄果实中 rhEGF 表达量的检测

称取成熟果实的重量, 用锋利的刀片将番茄果实切成小块, 每克果实加 1 ml 蛋白提取液(10 mM Tris-Cl, pH8.0), 在高压匀质机中粉碎成匀浆。首先, 匀浆在 4℃低温离心机中以 6 000 rpm 离心 10 min, 上清液转移至另一新管中, 然后在 4℃以 12 000 rpm 再离心 10 min, 收集上清液。用放射免疫法检测果实中 rhEGF 的含量(按人 EGF 放射免疫试剂盒说明书进行操作)。

2.9 迷你番茄果实中 rhEGF 对实验动物胃粘膜的保护作用

取昆明种小鼠(20±g)40 只, 分为生理盐水对照组、标准 hEGF 对照组、非转基因果对照组和转 hEGF 基因果组, 每组 10 只。实验前禁食 24 h, 自由饮水。每只小鼠灌同体积(0.5 ml)的相应溶液。30 min 后, 给每只小鼠灌 0.1 ml 的无水乙醇。又 1 h 后, 将小鼠脱颈处死, 解剖取胃, 结扎贲门和幽门, 用注射器从胃体注射 1 ml 1%福尔马林溶液, 并将胃整个浸于 1%福尔马林液中固定 1 h 以上。从外部观察胃体充血情况, 然后沿胃大弯切开胃体, 测量溃疡大小并计算胃溃疡指数(点状或条索状长度小于 1 mm 者计 0.5 分, 条索状损伤的长度>1 mm 者, 每 mm 计 1 分, 若其宽度也>1 mm 者, 将其计分加倍。计分之和为该动物的溃疡指数)。

3 结果与分析

3.1 表达载体 p2300-2A11-hEGF 的检测

分别以 2A11 启动子和 hEGF 目的基因进行 PCR 扩增检测。以 2A11 的一对引物扩增重组质粒, 得到了大小为 800 bp 左右的特异条带; 以 hEGF 的一对引物扩增, 得到了大小为 180 bp 左右

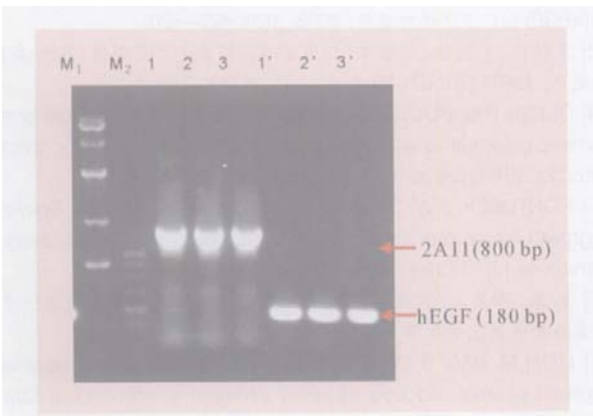


图 2 重组质粒 p2300-2A11-hEGF 的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of the recombinant p2300-2A11-hEGF

(M₁: DNA markers (7000, 5500, 3500, 2000, 1000, 500 bp); M₂: (600, 500, 400, 300, 200, 100 bp); Lane 1-3: PCR products with 2A11 primers; Lane 1'-3': PCR products with hEGF primers)

的特异条带, 它们都与预期的结果相符(见图 2, 1 和 1'; 2 和 2'; 3 和 3 均分别是同一的质粒)。将所构建的载体进行测序(结果未显示), 证明构建的 p2300-2A11-hEGF 表达载体是正确的。

3.2 迷你番茄的转化及植株再生

迷你番茄 cg2001-14 幼嫩的子叶, 经转化、共培养、筛选分化、再生苗诱导、生根和移栽等系列操作, 最后得到 6 株抗性苗, 通过人工辅助授粉, 都结出了果实。任选 2 个再生植株的幼嫩叶片, 分别提取各自的基因组 DNA 作为模板, 以 2A11 启动子和 hEGF 基因的引物分别进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 以 2A11 启动子的引物进行 PCR 扩增时, 无论是非转基因对照番茄还是转基因番茄, 在 800 bp 处都扩增出了信号较强的特异带(图 3), 因为 2A11 启动子是迷你番茄自身的 DNA 序列。而以 hEGF 的引物扩增时, 转基因番茄和对照质粒在 180 bp 处都扩增出了特异性很强的条带(见图 3。1, 2, P), 而非转基因对照番茄无此条带(图 3, C), 证明目的基因 hEGF 已经整合到番茄的基因组中(注: 在 PCR 反应体系中所加的植物基因组 DNA 的量为 2 μl, 在最上方出现了背景带, 这是番茄植株的基因组 DNA)。

3.3 迷你番茄果实中 rhEGF 含量的测定

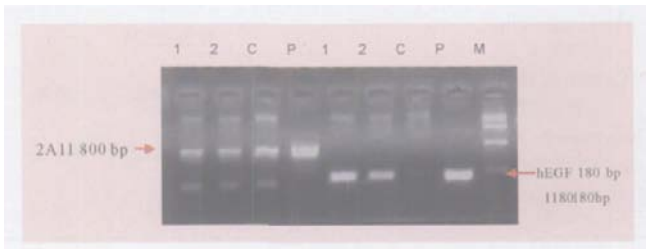


图 3 抗性植株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of the resistant plants

Lane 1 and 2: PCR of transgenic tomato leaves; C: PCR of the non-transgenic control tomato leaf; P: PCR of the plasmid p2300-2A11-hEGF; M: DNA markers

以农杆菌 C58 做为工程菌, 转化质粒 p2300-2A11-hEGF 到 cg2001-14 迷你番茄中, 得到 6 株成活苗, 并均结出果实。经检测证明, 其中 4 株所结的果实中 rhEGF 为阳性(Tab 1)。测量结果表明, 各阳性植株中 rhEGF 的含量都明显高于非转基因番茄对照组, 说明人 EGF 基因在迷你番茄果实中得到了表达, rhEGF 平均含量达到 3.85±0.86 ng/g 鲜果。

3.4 转 p2300-2A11-hEGF 迷你番茄果汁对乙醇诱导的小鼠胃溃疡的保护作用

无水乙醇能导致小鼠胃粘膜充血、溃疡, 甚至糜烂。2.5 ml/kg 乙醇不能保证每只小鼠都形成溃疡, 7.5 ml/kg 的剂量太高, 又有些小鼠死亡, 而 5 ml/kg 比较合适, 既能保证每只小鼠都形成溃疡, 又不至于死亡。

将昆明种小鼠随机分成生理盐水对照组、非转基因番茄对照

表 1 转基因迷你番茄果实中重组 hEGF 的含量
Tbl. 1 rhEGF levels in the transgenic mini-tomato fruits

Mini-tomatoes/迷你番茄	Number of fruits (n) 果实数目	rhEGF(ng/g)
Non-transgenic control/非转基因番茄对照	6	0.76±0.44
Transgenic fruit 1/转基因番茄果实 1	6	4.39±0.82*
Transgenic fruit 2/转基因番茄果实 2	6	3.21±0.45*
Transgenic fruit 3/转基因番茄果实 3	6	4.88±1.23*
Transgenic fruit 4/转基因番茄果实 4	6	2.93±0.93*

注: *Compared with control, /与对照果实相比 $\bar{p}<0.01$; $\bar{x}\pm s$ = 3.85±0.86 ng/g

组、市售 hEGF 对照组和转基因番茄组。分别以 0.5 ml (转基因番茄提取液和标准品中 hEGF 的含量都是 3 ng) 的相应溶液灌胃, 同时禁食和禁水。半小时后向胃内灌注 0.1 ml 无水乙醇, 1 h 后脱颈处死取胃, 用 1% 福尔马林固定。从胃的外部就可以看到生理盐水对照组小鼠的胃壁充血严重, 胃内有成条或成片的血块。非转基因番茄对照组从外部也能看到条索状的充血带, 但成片出血现象没有生理盐水对照组严重。市售 hEGF 组和转基因番茄组胃损伤相对较轻。

将胃剖开后, 可看到生理盐水对照和非转基因对照组小鼠的胃内出血, 胃粘膜红肿脱落严重。而转基因番茄组胃粘膜较完整, 溃疡指数明显小于上述 2 组对照小鼠, 溃疡抑制率也显著降低 (表 2)。此外, 可以看出转基因迷你番茄果汁的预防效果略优于市售 hEGF。

表 2 重组 hEGF 对乙醇诱导的小鼠急性胃溃疡的预防作用
Tbl. 2 The prophylactic effect of rhEGF against acute gastric ulcer induced by alcohol in micel

Group/分组	hEGF (ng/mouse 鼠)	Number of mice/ 小鼠的数量	Ulcer index/ 溃疡指数	Inhibition rate/ 抑制率(%)
Physiological saline/ 生理盐水	-	10	52.20±3.24	0
Commercial hEGF/ 标准 hEGF	3.00	10	28.55 ±1.60**	45.36
Non-transgenic tomato juice/非转基因番茄汁	-	10	45.25 ±21.36 ^c	13.26
Transgenic tomato juice/ 转基因番茄汁	3.00	10	21.20±6.84***	59.39

注: Compared with control/与对照番茄相比 *p>0.05; **p<0.05; ***p<0.01

4 讨论与结论

本研究成功地构建了适于在植物中表达的 hEGF 基因的表达载体 p2300-2A11-hEGF。分子生物学检测证明, 该基因已整合到迷你番茄的基因组中, 并证明 hEGF 基因在转基因番茄果实中表达, rhEGF 平均含量 3.85±0.86 ng/g 鲜果。非转基因迷你番茄果实中也检测到了少量 (0.76±0.44 ng/g) EGF 免疫反应阳性物质, 可能是其番茄自身的内源性 EGF。

EGF 可增加细胞透明质酸及细胞表面糖蛋白的含量, 增强鸟氨酸脱羧酶 (ornithine decarboxylase, ODC) 的活性并促进多胺的合成, 它们在保护胃肠道粘膜中起着十分重要的作用^[13]。此外, EGF 还能促进疏基化合物的合成、增加胃粘膜血流量、增加粘液糖蛋白合成和分泌。无水乙醇能使粘膜血流量明显降低, 注入外源性 EGF 15 min 内胃粘膜血流量明显增加, 提示 EGF 的快速保护作用也可能与增加胃粘膜血流有关^[14]。在动物实验中, EGF 与奥美拉唑或其他纤维素等物质联合使用, 可发挥协同作用, 加速溃疡愈合^[15-16]。本研究的动物实验表明, hEGF 转基因迷你番茄的果实能较好地预防酒精引起的急性胃溃疡。本实验仅在灌酒前 30 min 用 rhEGF 灌胃 1 次, 溃疡抑制率即可达约 60%。口服 EGF 可储存在消化道粘膜 (图像未列出), 若经常服用此果汁, 将会收到更好的效果。转基因迷你番茄果实中的 rhEGF 比市售 hEGF 纯品效果要好些, 可能纯 hEGF 溶解于生理盐水, 灌入小鼠胃后较易受到消化酶的降解, 而番茄中的其他蛋白对 rhEGF 有一定的保护作用, 能抵抗消化酶的降解, 增加其稳定性, 延长作用于受体的时间。转基因迷你番茄的内源性 EGF 及抗氧化物质也可能发挥一定的作用。

本研究在转基因番茄的果实中检测到了 rhEGF 的存在, 每克鲜重果实中 hEGF 的平均含量为 3.78 ng, 最高含量可达 4.88

±2.23 ng/g。正常人唾液及胃液中 hEGF 的含量分别为 1.5~5.0 ng/ml 及 0.11~0.73 ng/ml^[17]。hEGF 含量低的人群或者是由于唾液及胃液中 hEGF 减少而得溃疡病的患者, 每天适当口服 rhEGF 转基因迷你番茄将会增进他们的健康, 预防溃疡的发生。特别是饮酒前后吃些 rhEGF 转基因迷你番茄, 将有效地保护胃粘膜免受损伤。

转基因迷你番茄与其他番茄一样适应性很广, 条件适宜的情况下可陆地种植, 冬天可温室大棚种植, 一年四季不受季节的影响; 甚至也可在温室中无土栽培, 生长期达 2 年, 能长成番茄树, 一株结果达 2 万多颗; 能同时达到观光游览、果实采摘的目的, 增加经济效益。该技术成熟, 有良好的开发前景。

参考文献 (References)

- [1] 智庆文, 李 前, 王淑豪, 等. 谷胱甘肽-S-转移酶-人表皮生长因子融合蛋白基因的表达及其产物的生物活性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19(2): 113-117.
- [2] 周 亮, 王世岭, 马建丽, 等. 重组人表皮生长因子治疗烧伤 100 例 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9 (6): 399-401.
- [3] 付小兵, 程 飏, 盛志勇. 生长因子应用于临床创伤修复——十年的主要进展与展望 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(6): 508-812.
- [4] CALABRO A, MILANI S, PALADINI I, et al. Role of epidermal growth factor in peptic ulcer healing [J]. Digestive Diseases and Sciences, 1995, 40(11): 2497-2504.
- [5] 于正龙, 沈炳棣. 表皮生长因子治疗消化性溃疡的研究 [J]. 中华消化杂志, 1994, 14(2): 119-20.
- [6] 陈寿坡, 陆国均, 温淑豪. 消化性溃疡患者唾液、胃液和血清中表皮生长因子含量的研究 [J]. 中华消化杂志, 1994, 14(1): 15-17.
- [7] 许春娣, 奚容平, 陈舜年, 等. 消化性溃疡患儿唾液、胃液和血清中表皮生长因子含量 [J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(11): 661-663.
- [8] WANG G L, YI Q, FANG H J. Transforming and secreting expression of human egf in mutant strain WYBS2001 of Bacillus and its functions [J]. Acta Genetica Sinica, 2003, 30(2): 97-102.
- [9] 黄秉仁, 蔡良婉, 王 欣, 等. 甲基营养型酵母系统表达的重组人表皮生长因子的纯化及其性质 [J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(2): 106-110.
- [10] 陈 溪, 林忠平. 用转基因番茄生产人胰岛素的研究 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(4): 81-83.
- [11] 王仁厚, 王兴智. 转基因番茄表达人酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF) [J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 425-426.
- [12] 王跃驹, 李刚强, 刘德虎. 利用转基因植物生产新型疫苗 [J]. 高技术通讯, 1997(12): 57-60.
- [13] OLSEN P S, POULSEN S S, KIRKEGAARD P, et al. Role of sub-mandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection [J]. Gastroenterology, 1984, 87: 103-109.
- [14] KONTUREK J W, BRZOZOWSKI T, KONTUREK S J. Epidermal growth factor in protection, Repair, and healing of gastro-duodenal mucosa [J]. J Chini Gastroenteral, 1991, 13: 88-96.
- [15] 夏 敏, 陶嘉泳. 表皮生长因子在胃十二指肠溃疡愈合中的作用 [J]. 国外医学消化疾病分册, 1995, 5(2): 70-73.
- [16] ITOH M, IMAI S, JOH T, et al. Protection of gastric mucosa against ethanol-induced injury by intragastric bolus administration of epidermal growth factor combined with hydroxyl propyl cellulose [J]. J Clin Gastroenterol, 1992, 14 suppl, 1: S 127-130.
- [17] KONTUREK J W, BIELANSKI W, KONTUREK S J, et al. Distribution and release of EGF in man [J]. Gut 1989, 30(9): 1194-1200.

(责任编辑 李慧政)