

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.011

Rabex-5 基因 RNAi 慢病毒表达载体的构建及其在 MCF-7 中对 Rabex-5 表达的影响

闵捷, 厉红元, 潘雪, 李焰, 王颖建, 张翔, 梁欣洁

(重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建 Rabex-5 RNAi 慢病毒表达载体,并转染人乳腺癌细胞株 MCF-7,观察其对 Rabex-5 基因的沉默效应。方法:将设计合成的单链引物退火成双链 oligo 序列,连接入经 Age I 和 EcoR I 双酶切线性化的 pMAGic 慢病毒质粒载体中,经转化 DH5 α 感受态细胞并筛选出阳性克隆,测序鉴定。用 293FT 细胞包装产生慢病毒,感染 MCF-7 细胞,利用 Real-time PCR 和 Western blot 鉴定抑制 Rabex-5 表达的效果。结果:PCR 与测序鉴定证实成功构建了 Rabex-5 RNAi 的慢病毒载体,转染 MCF-7 细胞后,与未干扰组和阴性对照组相比,Rabex-5 的 mRNA 和蛋白表达下调,以 RNAi3 的沉默效应最佳。结论:成功构建了 Rabex-5 RNAi 慢病毒表达载体,其可使 MCF-7 细胞株 Rabex-5 表达下调,为进一步研究靶向 Rabex-5 RNAi 对乳腺癌细胞恶性生物学行为变化及基因治疗研究奠定了实验基础。

【关键词】Rabex-5;RNA 干扰;慢病毒载体;人乳腺癌细胞株 MCF-7

【中国图书分类法分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-09

Construction of a lentiviral vector for shRNA of Rabex-5 gene and its effect on Rabex-5 expression in MCF-7

MIN Jie, LI Hongyuan, PAN Xue, LI Yan, WANG Yingjian, ZHANG Xiang, LIANG Xinjie

(Department of Endocrine Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct a lentiviral vector for RNA interference (RNAi) of Rabex-5 gene and to detect its silence effect on Rabex-5 in MCF-7 cells. **Methods:** The synthesised single-stranded primer was annealed to double-stranded oligo sequences and sub-cloned into linear pMAGic lentiviral plasmid vector digested by enzyme Age I and EcoR I. DH5 α competent cells were transformed and positive clone were screened, identified and sequenced. The recombinant lentivirus was packaged into mature lentivirus by 293FT cells and used to infect MCF-7 cells. The expression of Rabex-5 in the cells was detected by real-time PCR and Western blot. **Results:** PCR and sequencing verified that the recombinant lentivirus plasmid Rabex5-shRNA was successfully constructed. Compared with the negative control and the blank control cells, Rabex-5 mRNA and protein level was reduced in MCF-7 cells infected by lentivirus. RNAi3 had the best effect of gene silence. **Conclusion:** The lentiviral RNAi expression vector targeting Rabex-5 gene is successfully constructed and it can downregulate the expression of Rabex-5 in MCF-7 cells, which lays the experimental foundation for the research on the changes of malignant biological activity of tumor cell lines and gene therapy.

【Key words】Rabex-5; RNA interference; lentiviral vector; MCF-7

Rabex-5 是近年来发现的 1 个 Rab5 的鸟苷酸交换因子 (Guanine nucleotide exchange factor, GEF), 最初由 Horiuchi 等^[1]鉴定出来, 含有 492 个氨基酸残基, 由 6 个主要的结构域组成。在细胞内定位于细胞质内, 作为主要的鸟苷酸交换蛋白发挥激活 Rab5 的功能并参与调节细胞吞噬过程中的囊泡融合等作用^[2-5]。Rabex-5 表达的异常可能导致 Rab5 介导的胞吞过程中囊泡融合的障碍, 从而导致细胞吞噬障碍^[6]。相关研究显示^[7,8], Rabex-5 在乳腺癌、结肠癌细胞系 SW480 中高

表达, 提示 Rabex-5 可能是潜在的肿瘤相关基因。本实验通过构建干扰 Rabex-5 的慢病毒重组质粒, 感染乳腺癌细胞株 MCF-7, 建立靶向干扰 Rabex-5 表达的乳腺癌细胞株, 在细胞水平进一步研究 Rabex-5 在乳腺癌发病过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及设备 pMagic 7.1 购自上海生博公司。Annealing Buffer for DNA; Oligos (5X) 购自碧云天公司。Taq 酶、dNTP、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DL2000 DNA Marker 以及 DH5 α 感受态细胞购自 Takara 公司。T4 DNA ligase

作者介绍: 闵捷 (1983-), 男, 硕士,

研究方向: 乳腺肿瘤基础研究。

通信作者: 厉红元, 男, 主任医师, Email: hongy_li@hotmail.com。

基金项目: 重庆市教委基金资助项目 (编号: KJ100317)。

购自 Fermentas 公司。*Age* I、*Eco*R I 购自 NEB 公司。M-MLV 逆转录酶、Rnase Inhibitor、小抽试剂盒购自 Promega 公司。Lipofectamine 2000, Trizo 购自 Invitrogen 公司。一抗 Rabbit Anti-Rabex-5 购自 Santa-Cruz 公司。引物合成自上海捷瑞生物工程有限公司。阳性克隆测序为华大基因公司。凝胶成像仪来自上海天能科技有限公司。荧光显微镜为奥林帕斯公司的 micropublisher 3.3RTV 型号。Real time PCR 仪器为 ABI 公司的 7500 型号。

1.1.2 细胞株及其培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7 为重庆医科大学附属第一医院肿瘤研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 构建表达 shRNA 的慢病毒载体 siRNA 设计根据 GenBank 数据库中人 Rabex-5 序列 (GenBank No. NM_014504), 选取 4 个长度为 19 bp 的特异性寡核苷酸作为靶序列, 编号为 pLVT540 (CCCTCACCATTCTCCAAGTT); pLVT541 (CCTTCCATAAACCGGCAAAA); pLVT542 (GGATGCAAACTCGTGGGAA); pLVT543 (GCATCACCAAGTGCAGCAA)。选取其中 1 个序列并无基因同源性作为阴性对照序列序: pLVT7 (TTCTCCGAACGTGTCACGT)。使用 *Age* I 和 *Eco*R I 双酶切 pMagic 7.1 载体以使其线性化, 然后利用 T4 噬菌体 DNA 连接酶将其与退火的双链 oligo 于 16℃ 连接过夜, 之后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取重组阳性克隆行 PCR 及测序鉴定 (华大基因)。

1.2.2 慢病毒包装及滴度测定 向灭菌离心管中加入所制备的各 DNA 溶液 (pGC-LV 载体 9 μ g, pLP1 载体 5 μ g, pLP2 载体 4 μ g, pLP/VSVC 载体 3 μ g) 按 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 使用说明进行共转染 293FT 细胞, 转染后 8 h 更换为完全培养基, 培养 48 h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液。对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液, 分装后保存在病毒管中, -80℃ 长期保存。取其中 1 支进行病毒生物学滴度测定。在 293FT 细胞中用 Real time 定量 PCR 法测定滴度 (Real-time PCR 在 ABI7500 上完成, SYBR Master Mixture 来自 TAKARA 公司)。

1.2.3 重组慢病毒感染 MCF-7 首先考查慢病毒感染 MCF-7 细胞株后的感染效率。选择感染效率高 (>80%)、MOI 值低的感染条件, 进行后续筛靶实验。将 MCF-7 细胞按 40% 的融合度接种到 24 孔板。MCF-7 细胞配成 3.2×10^5 个/ml 细胞悬液, 待铺板; 每孔铺 500 μ l, 即 1.6×10^5 个/well。12~20 h 后感染病毒, 根据 MOI 值, 加入相应量的病毒, 加药量计算方法: (细胞数 $\times$ MOI 值/病毒原液滴度) $\times 10^3$ = 病毒加药量 (μ l)。加 polybrene, 24 h 后换培养基, 感染 72 h 后拍荧光照片, 分析感染效率。选择最佳感染条件进行后续筛靶实验。实验分组为: 未感染任何病毒的细胞组为 CON 组 (Control); 加阴性对照病毒感染的细胞组为 NC 组 (Negative control); RNAi1 (PLVT540)、RNAi2 (PLVT541)、RNAi3 (PLVT542) 和 RNAi4 (PLVT543) 分别为加不同 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 靶点病毒感染的细胞组。

1.2.4 Real-time PCR 检测干扰后 Rabex-5 的表达 同时取 CON、NC、RNAi1-4 各组细胞各 1×10^6 个, 按照 Trizol 试剂

盒说明提取总 RNA, 在 M-MLV 逆转录酶作用下, 利用 Oligo (dt) 合成 cDNA 第一条链, Real-time PCR 检测干扰后和阴性对照各克隆细胞与 MCF-7 相比 Rabex-5 的表达差异。相对基因的表达用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析: ΔCt = 目的基因 Ct 值 - actin Ct 值; $-\Delta\Delta Ct$ = NC 组 ΔCt 平均值 - 各样品 ΔCt ; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映各样品相对 NC 组样品目的基因的相对表达水平。同一实验重复 3 次, 取其平均值。根据结果选择最有效靶点行 Real-time PCR 内源验证。

1.2.5 Western blot 检测干扰后 Rabex-5 的表达 选择 2 个有效靶点进行 Western blot 检测。Western blot 采用常规方法操作。收集 CON、NC、RNAi 各组细胞均约 1×10^6 个, 细胞裂解后离心, 上清液作为样品, BCA 法测定蛋白浓度。95℃ 水浴 5 min 变性, 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完毕后, 将蛋白转移至 PVDF 膜。封闭后加入兔抗人 Rabex-5 抗体 (Santa-Cruz, 1:800) 及抗 β -actin 抗体, 4℃ 反应过夜。第 2 天洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (Santa-Cruz, 1:3 000), 室温孵育 1 h, 化学发光法显示目的蛋白质。

2 结果

2.1 阳性克隆的 PCR 鉴定

连接产物转化 DH5a 大肠杆菌, 挑取平板上长出的转化子重悬于 10 μ l LB 培养液中, 从中取 1 μ l 做模板进行菌落 PCR 鉴定。Primer (+): hU6-F2 TACGATACAAGGCTGTTA-GAGAG; Primer (-): pM-R CTATTAATAACTAATGCATGGC。结果阳性克隆得到 331 bp 条带 (以 pLVT7 为标准, 其它靶点可能长度略有差异), 阴性克隆 (空载体自连) 得到 285 bp 条带, 表明目的片段已插入载体中 (图 1)。将阳性克隆保种并分装 100 μ l 送 DNA 测序 (华大基因公司), 测序结果显示各阳性克隆序列均正确, Rabex-5 慢病毒载体构建成功。

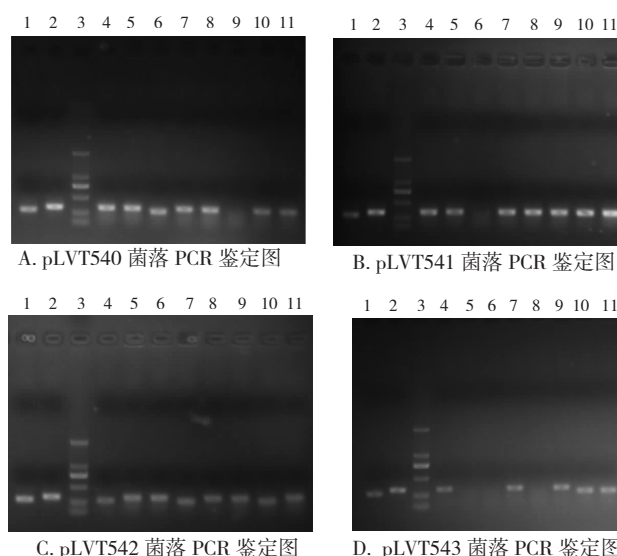


图 1 各阳性菌落的 PCR 鉴定
注: 1. 阴性对照 (空载体); 2. 阳性对照 (pLVT7); 3. DL2 000 DNA Marke (2 kb, 1 kb, 750 bp, 500, 250, 100 bp); 4~11 挑取的 8 个转化子

图 1 各阳性菌落的 PCR 鉴定
Fig.1 Identification of positive clones by PCR

2.2 慢病毒载体的包装及滴度测定

提取质粒,将慢病毒包装系统中质粒共转染 293 FT 细胞,48 h 后收集上清。病毒感染 72 h 后收取细胞抽取基因组 DNA 并做定量 PCR 实验测定滴度。测定滴度为 1×10^8 TU/ml,表明有大量质粒转入 293 FT 细胞,病毒成功包装。

2.3 慢病毒感染 MCF-7 细胞

选择感染效率高(>80%)、MOI 值低的感染条件,进行后续筛靶实验。感染时将病毒按不同的 MOI 数加入到 MCF-7 细胞中。结果 MCF-7 细胞在 MOI 5、MOI 10、MOI 20、MOI 40、MOI 80 组的感染率分别为 50%、80%、90%、95%、100% (图 2、3)。因此 MCF-7 细胞感染慢病毒 MOI 5 时,感染效率不高,MOI 10、MOI 20、MOI 40、MOI 80 时感染效率较高,可达到 80%以上。MCF-7 细胞的最佳感染条件为 MOI 10。

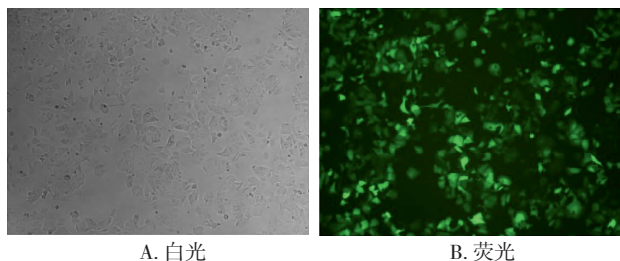


图 2 MOI=10 时慢病毒感染 MCF-7 细胞图片 (×100)

Fig.2 MCF-7 cells with virus infection (MOI=10, ×100)

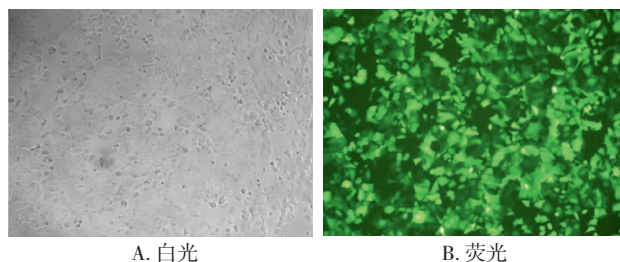


图 3 MOI=40 时慢病毒感染 MCF-7 细胞图片 (×100)

Fig.3 MCF-7 cells with virus infection (MOI=40, ×100)

2.4 Real-time PCR 检测干扰后 MCF-7 细胞中 Rabex-5 表达

荧光定量 PCR 的结果显示,各个干扰片段都有不同程度的 Rabex5 基因扩增。采用定量数值及分析($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法),Real-time PCR 检测结果显示(图 4、5):MCF-7 细胞中,相对 NC 组,靶点 RNAi3 对目的基因 Rabex5 表达的敲减效率达 75%以上,为 4 个靶点中最有效的靶点。RNAi2 在高 MOI 时,能达到 56%的敲减效率;靶点 RNAi1、RNAi4 的敲减效率稍低。因此,靶点 RNAi3 (PLVT542)为最有效靶点,选此靶点进行内源验证,并选择 RNAi3、RNAi2 靶点进行 Western blot 验证。溶解曲线显示扩增的为特异序列(图 6、7)。

2.5 Real-time PCR 验证有效靶点

选择 RNAi3 进行内源验证。Real-time PCR 检测结果显示(图 8、9):采用定量数值及分析($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法),MCF-7 细胞中,相对 NC 组,靶点 RNAi3 对目的基因 Rabex5 表达的敲减效率达 60%以上。

2.6 Western blot 结果

Western blot 结果显示:相对 NC 组 RNAi3、RNAi2 Rabex-5 表达降低,其中 RNAi3 干扰效率最高,与 Real-time PCR 检测结果一致(图 10)。

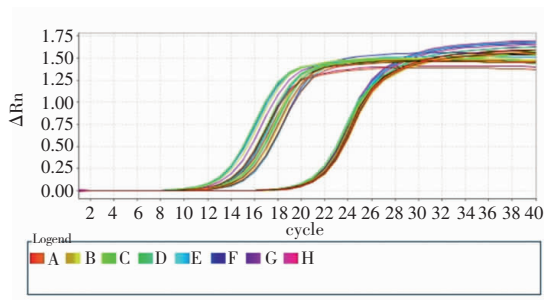


图 4 PCR 扩增曲线

Fig.4 PCR amplification plot

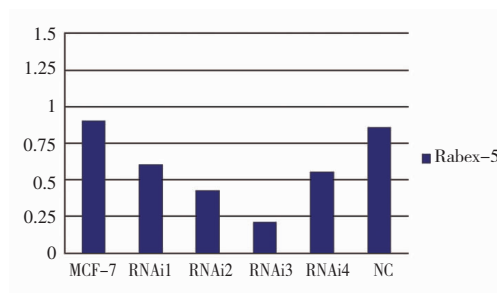


图 5 不同样本中 Rabex-5 的相对表达

Fig.5 Relative expression of Rabex-5 in different samples

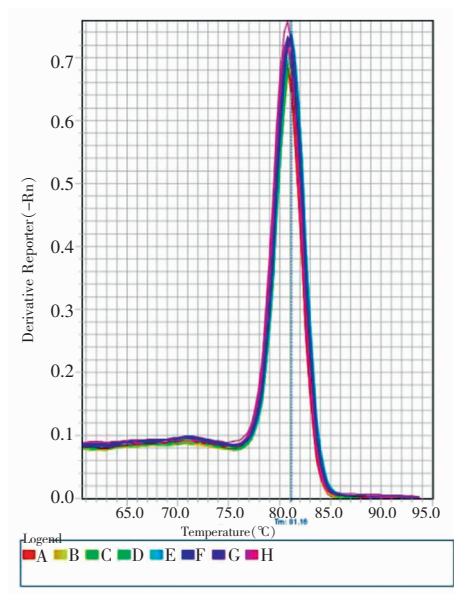


图 6 Rabex-5 扩增产物溶解曲线

Fig.6 Melt curve of Rabex-5 amplification product

3 讨论

Rabex-5 作为鸟苷酸交换蛋白发挥激活 Rab5 的功能,经二种途径将 Rab5 由无活性的 Rab5-GDP 形式转化为有活

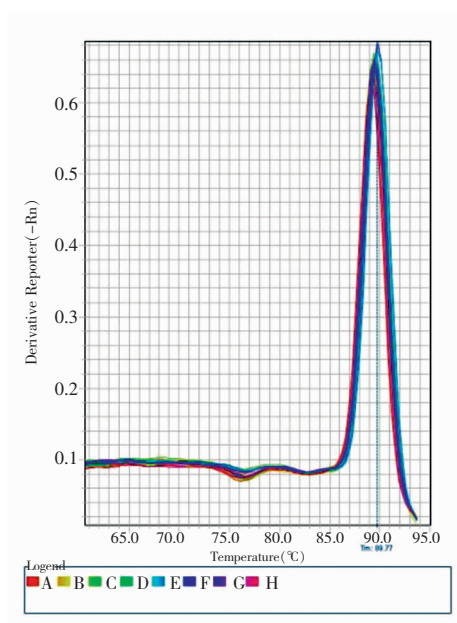


图 7 Actin 扩增产物溶解曲线

Fig.7 Melt curve of Actin amplification product

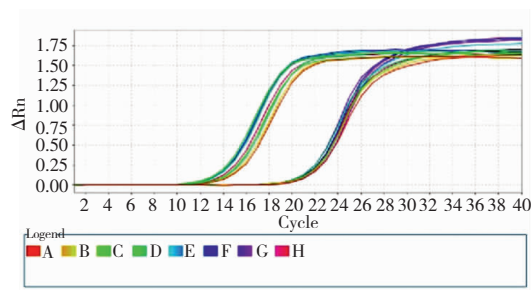


图 8 PCR 扩增曲线

Fig.8 PCR amplification plot

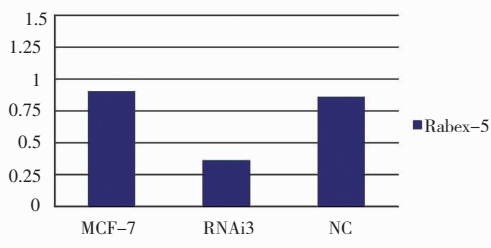


图 9 不同样本中 Rabex-5 的相对表达

Fig.9 Relative expression of Rabex-5 in different samples

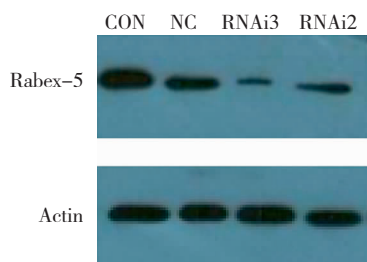


图 10 MCF-7 细胞 Rabex-5 蛋白表达的测定

Fig.10 Detection of Rabex-5 protein expression in MCF-7

吞过程中胞吞泡与早期内体的融合,是早期胞吞途径中一个重要的限速成分^[12,13]。Rab5 的高表达与乳腺癌、胃癌、肺癌和肝癌的恶性程度及转移能力呈正相关,相关证据表明 Rab5 是一个肿瘤相关基因^[14]。因此推测 Rabex-5 作为 Rab5 发挥功能最重要的一个激活物,也应是一个肿瘤相关基因。但目前国内外对 Rab5 在肿瘤领域的研究较多,对其激活物 Rabex-5 的研究甚少。在本课题前期研究中发现, Rabex-5 在乳腺癌组织中的 mRNA 及蛋白表达明显高于乳腺癌旁组织及乳腺良性病变组织,并在乳腺癌细胞株及乳腺上皮细胞株中得到了验证;且 Rabex-5 表达随肿瘤的增大及腋窝淋巴结的转移而增高,预示 Rabex-5 可能参与乳腺癌的生长及转移^[7]。

RNAi 是通过诱导特定基因 mRNA 降解,发挥抑制目的基因表达的作用。RNAi 技术具有特异性强、阻断效率高的特点。但是质粒介导 RNAi 因其转染率低,基因抑制表达作用弱,持续时间短,所以适用范围局限。慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒 I 为基础发展得来的,是目前感染效率最高的载体,既能感染分裂期细胞,又能感染分裂缓慢或非分裂期的细胞,并能在细胞内高效稳定的表达^[15]。慢病毒载体介导 RNAi 的技术近几年被广泛应用,其能安全持久地发挥下调基因表达的作用,大量体内外研究也表明该技术在研究功能基因组学和基因治疗领域具有重大意义。

为了进一步研究 Rabex-5 影响乳腺癌发生、发展的机制,通过构建靶向 Rabex-5 基因的 RNAi 慢病毒表达载体,干扰 MCF-7 细胞内源 Rabex-5 的表达来研究 Rabex-5 的功能及对乳腺癌的作用。首先设计并合成靶向 Rabex-5 的 shRNA 序列和一段无关序列,克隆到 pMagic 7.1 载体上,经 293FT 细胞包装产生高滴度病毒颗粒并感染 MCF-7 细胞。最后 Western blot 和 Real-time PCR 检测内源 Rabex-5 的表达,与未感染病毒和感染阴性对照病毒的 MCF-7 细胞相比, MCF-7 RNAi1-4 细胞 Rabex-5 的 mRNA 水平和 RNAi2-3 的蛋白水平均受到抑制,以 MCF-7 RNAi3 沉默效果最佳。实验发现慢病毒载体对 MCF-7 细胞 β -actin 无影响,说明干扰序列具有严格的特异性。因此确定成功构建了靶向 Rabex-5 基因的 RNAi 慢病毒表达载体,并能有效抑制 MCF-7 细胞中 Rabex-5 的表达,为进一步研究 Rabex-5 在乳腺癌发生、发展过程中的分子调控作用奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Horiuchi H, Lippé R, McBride H M, et al. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function[J]. Cell, 1997, 90(6): 1149-1159.
- [2] Xu L, Lubkov V, Taylor L J, et al. Feedback regulation of Ras signaling by Rabex-5-mediated ubiquitination[J]. Curr Biol, 2010, 20(15): 1372-1377.
- [3] Gómez del Pulgar T, Bandrés E, Espina C, et al. Differential expression of Rac1 identifies its target genes and its contribution to progression of colorectal cancer[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(12): 2289-

性的 Rab5-GTP 形式,而此过程的异常激活可能导致疾病的发生^[9-11]。Rab5a 是 Rab 蛋白家族成员之一,主要负责调控胞

2302.

[4] Zhu H, Liang Z, Li G. Rabex-5 is a Rab22 effector and mediates a Rab22-Rab5 signaling cascade in endocytosis[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(22): 4720-4729.

[5] van den Hove M F, Croizet-Berger K, Tyteca D, et al. Thyrotropin activates guanosine 5'-diphosphate/guanosine 5'-triphosphate exchange on the rate-limiting endocytic catalyst, Rab5a, in human thyrocytes in vivo and in vitro[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(7): 2803-2810.

[6] Mattera R, Bonifacino J S. Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes[J]. *EMBO J*, 2008, 27(19): 2484-2494.

[7] 王颖建, 厉红元, 李 焰, 等. RABEX-5 和 RAB5 在乳腺癌中的表达及意义[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2011, 42(2): 185-189.

Wang Y J, Li H Y, Li Y, et al. The expression and clinical significance of RABEX-5 and RAB5 in breast cancer[J]. *Sichuan Univ (Med Sci Ed)*, 2011, 42(2): 185-189.

[8] Nimmrich I, Erdmann S, Melchers U, et al. Seven genes that are differentially transcribed in colorectal tumor cell lines[J]. *Cancer Lett*, 2000, 160(1): 37-43.

[9] Yan H, Jahanshahi M, Horvath E A, et al. Rabex-5 ubiquitin ligase

activity restricts Rassignaling to establish pathway homeostasis in *Drosophila*[J]. *Curr Biol*, 2010, 20(15): 1378-1382.

[10] Zhu H, Qian H, Li G. Delayed onset of positive feedback activation of Rab5 by Rabex-5 and rabaptin-5 in endocytosis[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9226.

[11] 王颖建, 厉红元. Rabex-5 及其激活物 Rab5 的研究进展[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2011, 5(2): 134-136.

Wang Y J, Li H Y. Research progress of Rabex-5 and down stream protein Rab5[J]. *Chin J Endocr Surg*, 2011, 5(2): 134-136.

[12] Olchowik M, Miaczyńska M. Effectors of GTPase Rab5 in endocytosis and signal transduction[J]. *Postepy Biochem*, 2009, 55(2): 171-180.

[13] Galvis A, Balmaceda V, Giambini H, et al. Inhibition of early endosome fusion by Rab5-binding defective Ras interference 1 mutants[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 482(1-2): 83-95.

[14] Li Y, Feng C H, Chen Y. RAB5A, a gene possibly related to metastasis of human carcinoma of the lung and stomach[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 1999, 21(3): 178-181.

[15] Jakobsson J, Lundberg C. Lentiviral vectors for use in the central nervous system[J]. *Mol Ther*, 2006, 13(3): 484-493.

(责任编辑: 冉明会)

(上接第 29 页)

2 讨论

淀粉样变性是不溶的免疫球蛋白轻链片段, 聚集形成原纤维, 在细胞外异常沉积, 引起各器官功能障碍的一种浆细胞病。12%~15% 的多发性骨髓瘤患者可并发淀粉样变性, 其主要表现为肾病综合征、充血性心力衰竭、限制性心肌病、肝脾肿大、腕管综合征、巨舌症及皮肤蜡样丘疹^[2]。当淀粉样物质沉积于胃肠道的黏膜、血管、肌层时, 临床表现各异, 如恶心、呕吐、吞咽困难、胃轻瘫、胃食管反流、食欲减退、便秘等^[3]。部分患者因胃肠道动力障碍可出现小肠假性肠梗阻。而黏膜糜烂、溃疡者则可表现为反复消化道出血。当大量的淀粉样物质在胃内沉积, 形成肿瘤样的淀粉样结节时, 便很难与胃癌相鉴别, 只有病理活检才能证实为淀粉样变性。

本例患者以胃潴留为首要表现, 缺乏多发性骨髓瘤及淀粉样变性的特征性症状, 2 次胃镜检查均提示胃窦癌, 极易误诊。鉴于胃淀粉样变性的内镜形态学难以与胃癌相区分, 胃

淀粉样变性可作为胃癌的鉴别诊断, 及时的病理活检是确诊的关键。对淀粉样变性应评判是原发性还是继发性, 临床工作者应考虑到多发性骨髓瘤所致淀粉样变性的可能。

参 考 文 献

[1] Bahlis N J, Lazarus H M. Multiple myeloma-associated AL amyloidosis: is a distinctive therapeutic approach warranted[J]? *Bone Marrow Transplant*, 2006, 38(1): 7-15.

[2] Gertz M A, Comenzo R, Falk R H, et al. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th international symposium on amyloid and amyloidosis[J]. *American Journal of Hematology*, 2005, 79(4): 319-328.

[3] Petre S, Shah I A, Gilani N. Review article: gastrointestinal amyloidosis—clinical features, diagnosis and therapy[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 27(11): 1006-1016.

(责任编辑: 关蕴良)