

[文章编号] 1000-1182(2011)04-0437-05

MHC- 类链相关基因A真核表达载体的构建 及稳定转染舌鳞癌细胞的实验研究

李超¹ 杨丹¹ 石芳琼¹ 李跃辉² 陈新群¹ 翦新春¹ 蒋灿华¹

(1.中南大学湘雅医院 口腔颌面外科; 2.中南大学 肿瘤研究所, 长沙 410078)

[摘要] 目的 构建人类MHC- 类链相关基因A(MICA)的真核表达载体, 转染人舌鳞癌高转移Tca8113-Tb细胞, 建立稳定过表达MICA基因的口腔鳞癌细胞系。方法 采用PCR技术扩增pCMV-SPORT6-MICA中编码MICA基因的cDNA序列, 重组至有绿色荧光蛋白标记的真核表达载体pEGFP-N1, 构建最终的表达载体pEGFP-N1-MICA, 脂质体法转染Tca8113-Tb细胞, G418筛选, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达, 有限稀释法建立稳定过表达MICA基因的Tca8113-Tb细胞系, RT-PCR、real time PCR和免疫细胞化学检测MICA在该细胞中的表达。结果 通过PCR技术获取了MICA基因并成功克隆入载体, 测序鉴定该序列与GenBank中的序列相同。转染的细胞可见绿色荧光蛋白表达, RT-PCR、real time PCR及免疫细胞化学检测到目的基因MICA在转染细胞中为过表达。结论 pEGFP-N1-MICA真核表达载体的成功构建与稳定转染Tca8113-Tb细胞系的建立, 为进一步研究该基因的功能奠定了良好的实验基础。

[关键词] MHC- 类链相关基因A; Tca8113-Tb细胞系; 质粒构建; 基因转染

[中图分类号] R 739.86 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.04.026

Construction of eukaryotic expression vector of major histocompatibility complex class -related chain A and establishment of its stable transfected Tca8113-Tb cell line Li Chao¹, Yang Dan¹, Shi Fangqiong¹, Li Yuehui², Chen Xinqun¹, Jian Xinchun¹, Jiang Canhua¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China; 2. Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

[Abstract] **Objective** To construct the eukaryotic expression vector, encoding major histocompatibility complex class -related chain A gene(MICA), for the further research of transfecting Tca8113-Tb cell line(a metastatic cell line of brain metastasis from human tongue cancer Tca8113 cells in nude mouse), and to establish a stable MICA overexpression oral squamous cell line. **Methods** cDNA of MICA gene from pCMV-SPORT6-MICA was amplified by PCR, and subcloned into eukaryotic expression vector pEGFP-N1 marked with green fluorescent protein(GFP). The recombinant plasmid was sequenced and transfected into Tca8113-Tb cell line by lipofectamine™ 2000. After screen culture by G418, stable transfected Tca8113-Tb cell line was established using definite dilution method. The expressions of GFP protein was viewed directly with fluorescence microscopy and the overexpression of MICA was identified by RT-PCR, real time PCR and immunocytochemistry. **Results** The MICA gene was amplified by PCR and then cloned into the vector, whose sequence was identical to that in the GenBank. The transfected cells showed the expression of GFP. And the overexpression of MICA gene in transfected cells was detected by RT-PCR, real time PCR and immunocytochemistry. **Conclusion** The recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-N1-MICA has been constructed successfully and stably expressed in Tca8113-Tb cell line, providing a foundation for further studies on the function of MICA *in vitro*.

[Key words] major histocompatibility complex class -related chain A; Tca8113-Tb cell line; plasmid construction; gene transfection

[收稿日期] 2010-07-23; [修回日期] 2011-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30772437); 湖南省科技计划一般基金资助项目(06sk3026)

[作者简介] 李超(1985—), 女, 湖南人, 住院医师, 硕士

[通讯作者] 蒋灿华, Tel: 0731-84327015

口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤, 经过以手术为主、放化疗为辅的综合序列治疗后, 仍有多于1/3的患者5年内死于肿瘤的局部复发或远处转移。已有研究表明: 口腔鳞癌患者的免疫功能低下, 因而通过免疫治疗来提高其生存率已成

为目前的一个研究热点。自然杀伤(natural killer, NK)细胞是机体抵御肿瘤和病毒感染的第一道防线,其功能取决于细胞表面活化性受体与抑制性受体的平衡。自然杀伤细胞2族成员D(natural killer group 2 member D, NKG2D)是新近研究较多的NK细胞活化性受体,且其单独活化足以刺激NK细胞活化。MHC-

类链相关基因A(major histocompatibility complex class -related chain A, MICA)作为一种应激诱导性配体,其主要功能是作为NKG2D的配体,与NKG-2D特异性结合,活化以NK细胞为主的免疫效应细胞,发挥免疫监视作用^[1-3],因此,通过MICA-NKG2D通路来调节机体的免疫功能有望成为肿瘤患者免疫治疗的一种新策略。本研究拟构建MICA基因的真核表达载体,建立稳定转染并过表达MICA基因的口腔鳞癌细胞系,为进一步通过MICA基因的调控来进行免疫治疗研究提供有效的生物表达体系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 表达载体及菌种 pCMV-SPORT6-MICA(Openbiosystem公司,美国), pEGFP-N1真核表达载体(北京诺赛基因组研究中心),人舌鳞状细胞癌脑高转移细胞系Tca8113-Tb(上海交通大学医学院附属第九人民医院肿瘤生物实验室提供)。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清及RPMI-1640培养基(Gibco公司,美国),脂质体lipofectamine™ 2000细胞转染试剂盒(Invitrogen公司,美国), *Bam*H、*Xho*核酸内切酶、Phusion DNA聚合酶(NEB公司,美国), T4 DNA Ligase(TaKaRa公司,日本),逆转录试剂盒(Fermentas公司,美国),普通质粒小提试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒、SYBY Green(北京天根生化公司), *Taq* DNA聚合酶(北京诺赛基因组研究中心), PCR MasterMix、DAB显色试剂盒(北京嘉美生物技术有限公司),山羊抗人MICA多克隆抗体(AF1300, R&D公司,美国),辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊IgG抗体(ABG公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 MICA基因全长的扩增 依据GenBank中MICA cDNA序列(注册号BC016929)设计引物,同时在上游引物5'端增加*Xho*的酶切位点,下游引物5'端增加*Bam*H的酶切位点。引物由上海英骏生物技术有限公司合成,序列如下:上游引物5'-CCGCTC-GAGCTATGGGGCTGGGCCCCGCTC-3',下游引物5'-CAGAATTCCTAGGTGCCCTCAGTGGAG-3'。PCR反应体系:5×Phusion HF Buffer 10 μL, pCMV-SPO-RT6-MICA 1 μL, MICA上游引物(10 μmol·L⁻¹)2 μL,

下游引物(10 μmol·L⁻¹)2 μL, Phusion(2 U·μL⁻¹) 0.5 μL, ddH₂O 33.5 μL。PCR反应条件:变性98℃ 2 min, 98℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 90 s, 32个循环,最后72℃延伸10 min。产物经1%琼脂糖凝胶电泳, DNA凝胶回收试剂盒回收、纯化目的基因。

1.2.2 pEGFP-N1-MICA真核表达载体的构建与鉴定 限制性核酸内切酶*Xho*和*Bam*H分别双酶切PCR产物与克隆载体pEGFP-N1,定向连接,将重组质粒转化入*DH5α*感受态细菌,含卡那霉素的LB琼脂平板筛选,挑选阳性克隆增菌培养,小量质粒抽提试剂盒抽提质粒, *Xho*、*Bam*H双酶切鉴定,测序, -20℃保存备用。

1.2.3 pEGFP-N1-MICA真核表达载体转染Tca8113-Tb细胞 Tca8113-Tb细胞常规培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640中,培养条件:37℃、5%CO₂、饱和湿度。取对数生长期Tca8113-Tb细胞以每孔5×10⁵个的密度接种于6孔板,倒置相差显微镜下观察细胞贴壁生长达80%融合时,按lipofectamine™ 2000细胞转染试剂盒操作步骤将质粒pEGFP-N1-MICA 4 μg、脂质体10 μL加入孔内,并以空白质粒pEGFP-N1代替pEGFP-N1-MICA作为对照,培养6 h后更换为完全培养基,48 h后在荧光倒置显微镜下观察细胞生长情况和转染效率。消化细胞,加入800 μg·mL⁻¹ G418进行筛选,转入24孔板内继续培养。筛选14 d后,挑取G418抗性单克隆至6孔板内培养,传代达20代后,在对数生长期收集细胞,进行以下各项鉴定实验。

1.2.4 RT-PCR及real time PCR鉴定MICA mRNA水平的过表达 采用TRIzol法分别抽提Tca8113-Tb、Tca8113-Tb-pEGFP-N1、Tca8113-Tb-pEGFP-N1-MICA 3种细胞的总RNA,按逆转录试剂盒说明书逆转录成cDNA,PCR检测MICA基因的表达,上游引物5'-ATAACCTCACGGTGCTGTCCT-3',下游引物5'-TTGGTCTTCATGGCATCTTC-3',以管家基因GAPDH作为内参照:上游引物5'-AATCCCATCACCATCTT-CCA-3',下游引物5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3',由上海英骏生物技术有限公司合成。反应体系:cDNA 1 μL,上游引物、下游引物各1 μL, ddH₂O 7 μL, 2×mix 10 μL。反应条件:95℃变性1 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 68℃ 90 s共25个循环; 68℃延伸10 min。进一步采用染料法real time PCR定量检测MICA基因过表达倍数,上游引物5'-CCTCTGA-GGCCTCCCTGCG-3',下游引物5'-CCTTGGCCAT-GAACGTCAGG-3',以管家基因β-actin作为内参照,上游引物5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3',下游引物5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'。反应体系:cDNA 1 μL,上游引物、下游引物各1 μL, 2.5×

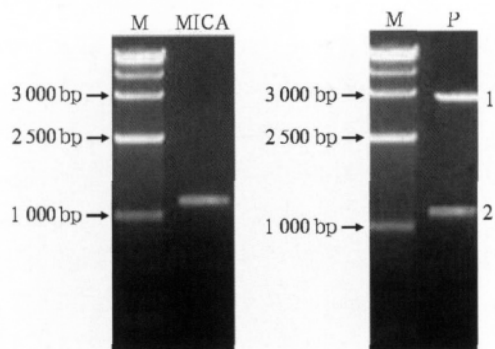
real Mastermix及20×SYBR solution混合物9 μL, 加ddH₂O至20 μL。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 72 °C 15 s, 共42个循环; 60 °C 20 s。每组设3个复孔, 以β-actin作为参照, 计算C_t均值, 应用相对定量法ΔΔC_t进行定量分析。

1.2.5 免疫细胞化学鉴定MICA基因在蛋白水平的过表达 消化对数生长期Tca8113-Tb、Tca8113-Tb-pEGFP-N1、Tca8113-Tb-pEGFP-N1-MICA 3种细胞, 接种于无菌载玻片上, 于37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养, 细胞贴壁后4%多聚甲醛固定30 min, 3%过氧化氢溶液孵育15 min以去除内源性过氧化物酶, 2%BSA封闭2 h, 滴加山羊抗人MICA多克隆抗体(一抗, 1:20)过夜, 阴性对照组用PBS代替一抗, PBS洗后孵育辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊IgG抗体(二抗, 1:100)1 h, DAB显色, 苏木素复染, 盐酸乙醇分色, 饱和碳酸锂返蓝, 逐级脱水, 中性树脂封片后镜检。细胞质、细胞膜呈棕黄染色者为阳性, 未染色者为阴性。

2 结果

2.1 MICA基因全长的RT-PCR扩增

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳显示: 扩增产物约1 341 bp, 与预期大小一致(图1左)。



M: Marker DL15000; P: 质粒; 1: 重组质粒双酶切后pEGFP-N1; 2: MICA。

图1 PCR扩增MICA基因全长序列(左)及pEGFP-N1-MICA双酶切凝胶电泳图(Xho I/BamH I)(右)

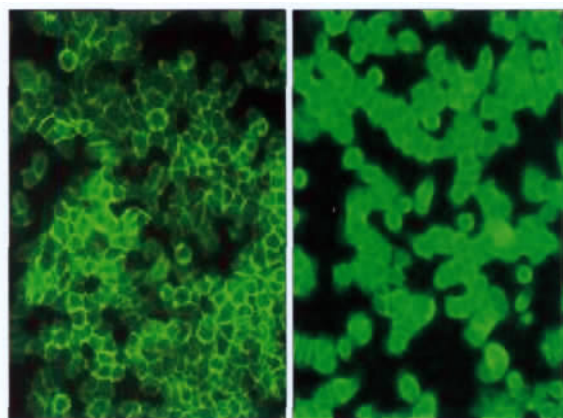
Fig 1 The full length of MICA was amplified by PCR(left) and pEGFP-N1-MICA was digested with Xho I and BamH I (right)

2.2 pEGFP-N1-MICA重组质粒酶切鉴定及其序列测定

pEGFP-N1-MICA重组质粒经Xho、BamH双酶切后, 在凝胶电泳上显示2个片段, 分别为1.3和3.0 kb, 证明MICA目的基因已成功克隆入重组质粒中(图1右)。挑取酶切阳性的克隆进行DNA序列测定, 应用Blast软件与GenBank中MICA(注册号BC016929)序列进行比较, 同源性和100%。测序结果完全相符。

2.3 稳定转染MICA基因细胞株的建立

用脂质体lipofectamine™ 2000细胞转染试剂盒将pEGFP-N1-MICA重组质粒转染Tca8113-Tb细胞, 48 h后在荧光倒置显微镜下观察细胞的生长情况, 同时与转入空白质粒pEGFP-N1及未转染的Tca8113-Tb细胞进行比较。由于融合表达载体pEGFP-N1本身含有绿色荧光蛋白, 故在荧光倒置显微镜下观察转染pEGFP-N1-MICA和pEGFP-N1质粒后的Tca8113-Tb细胞, 发现转染后带有肉眼可见绿色荧光的Tca8113-Tb细胞均达90%以上(图2)。



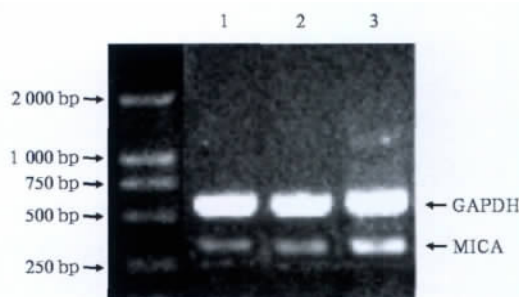
左: 目的质粒转染组; 右: 对照质粒转染组。

图2 Tca8113-Tb细胞质粒转染48 h后转染效率 荧光倒置显微镜 ×400

Fig 2 Transfection rate of the plasmids in Tca8113-Tb cells 48 h after transfection fluorescent inverted microscope ×400

2.4 转染后Tca8113-Tb细胞MICA mRNA表达变化

用TRIzol法提取转染pEGFP-N1-MICA、转染pEGFP-N1及未进行转染的3种Tca8113-Tb细胞总RNA, 半定量RT-PCR检测MICA mRNA的表达。电泳结果表明: 扩增产物大小约412 bp, 与预期一致。未转染及转染空白质粒pEGFP-N1的Tca8113-Tb细胞其MICA mRNA表达明显弱于转染pEGFP-N1-MICA的细胞(图3)。



1: 质粒pEGFP-N1-MICA转染组; 2: 对照质粒pEGFP-N1转染组; 3: 未转染质粒组。

图3 稳定转染并筛选建系后, RT-PCR检测Tca8113-Tb细胞MICA mRNA的表达

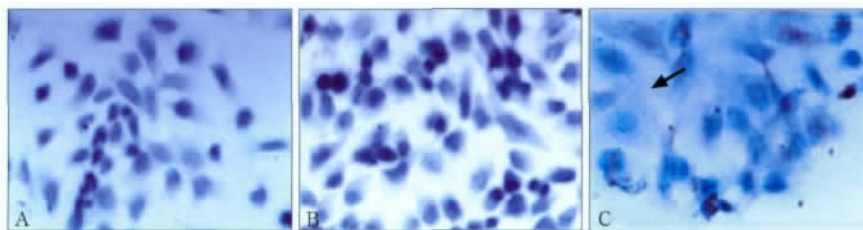
Fig 3 The mRNA level of MICA in Tca8113 cells were detected by RT-PCR after stable transfection and establishment of cell line

重复3次结果相符,认为稳定转染及筛选建株成功,转染质粒DNA已整合到Tca8113-Tb细胞染色体上。进一步用染料法real time PCR定量检测其表达增强倍数,结果显示转染pEGFP-N1-MICA细胞MICA mRNA的表达是转染空白质粒pEGFP-N1及未转染

Tca8113-Tb细胞的15.2倍。

2.5 转染后Tca8113-Tb细胞MICA蛋白表达变化

Tca8113-Tb及Tca8113-Tb-pEGFP-N1细胞MICA表达阴性,Tca8113-Tb-pEGFP-N1-MICA细胞MICA表达阳性,呈棕褐色,定位于细胞膜和细胞质(图4)。



A: 未转染质粒组; B: 对照质粒pEGFP-N1转染组; C: 质粒pEGFP-N1-MICA转染组(箭头表示阳性细胞)。

图4 稳定转染并筛选建系后,Tca8113-Tb细胞MICA蛋白的表达 SP ×400

Fig 4 The expression of MICA protein in Tca8113-Tb cells after stable transfection and establishment of cell line were detected SP ×400

3 讨论

MICA基因定位于人类第6号染色体短臂,分子结构包括3个胞外结构域($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$)、1个胞质区及1个跨膜片段,其表达不需要结合抗原肽,也不需要 β_2 微球蛋白的辅助^[4]。正常情况下仅在胃肠上皮表达,但在肿瘤、感染、自身免疫性疾病及器官移植等应激条件下表达上调。NKG2D属C型凝集素样受体,广泛表达于人类所有NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、 $\gamma\delta$ T细胞、未受刺激的外周血CD8⁺T细胞及活化的巨噬细胞表面。MICA分子作为一种应激诱导性配体,主要功能是与NKG2D特异性结合,传导活化信号,活化以NK细胞为主的免疫效应细胞,从而发挥免疫监视作用。此外,MICA分子还能够与CTL细胞的NKG2D结合促进其增殖,显著增强T细胞的细胞毒作用,并且MICA-NKG2D可替代CD28-B7产生共刺激信号,活化CTL,对T细胞产生协同刺激作用^[5-6]。因此通过MICA-NKG2D通路来调节机体的免疫功能有望成为肿瘤患者免疫治疗的一种新策略。

MICA分子在机体中存在2种功能形式,即细胞表面的膜结合型MICA(member MICA, mMICA)和游离状态的可溶性MICA(soluble MICA, sMICA),二者在免疫效应中的作用恰好相反。mMICA对免疫效应的调节为正向调节,NK细胞和CD8⁺T细胞容易清除异常表达此种配体的肿瘤细胞;sMICA则为负向调节,可以诱导NKG2D的内化和降解,促进肿瘤逃逸免疫应答。已有研究表明:mMICA可通过多种机制脱落而成为sMICA。Kaiser等^[7]发现内质网蛋白5(endoplasmic reticulum protein 5, ERp5)可与mMICA形成短暂的混合性二硫化复合物,诱导MICA构象变化促进其水解断裂,使mMICA从细胞表面脱落。Wang

等^[8]进一步证实位于MICA $\alpha 3$ 结构域的第6位氨基酸基序是ERp5与MICA作用的关键位点。而Waldhauer等^[9]则发现此脱落过程可被解聚素和金属蛋白酶(adi-sintegrin and metalloproteinase, ADAM)特异性抑制剂阻断,沉默ADAM10或ADAM17均可抑制mMICA脱落,而蛋白激酶C则可促进MICA脱落。此外,MICA的表达还受多种因素的调控,如干扰素- α 、曲古霉素A、丁酸钠等可增强MICA的表达,而干扰素- γ 、转化生长因子- β 则下调MICA的表达^[10-12]。因此,如果能采取措施上调MICA的表达同时抑制其脱落,无疑可增强肿瘤细胞对表达NKG2D的免疫效应细胞的敏感性,达到免疫治疗的效果。

本研究采用分子生物学技术成功构建了MICA基因的真核表达载体pEGFP-N1-MICA,脂质体法转染人舌鳞癌脑高转移细胞株Tca8113-Tb,经G418筛选,有限稀释法建立单克隆细胞系,现已传至20代以上。RT-PCR、real time PCR及免疫细胞化学检测显示,转染后的Tca8113-Tb细胞MICA mRNA和蛋白分子均呈过表达状态,表明已成功建立稳定过表达MICA基因的口腔鳞癌细胞系,从而为通过MICA基因的调控来进行口腔鳞癌的免疫治疗研究提供了有效的生物表达体系。

已有研究证实,从肿瘤细胞表面脱落的sMICA对免疫效应起负向调节作用,肿瘤患者血清中sMICA的表达水平与肿瘤分化、临床分期及生存时间等存在相关性,并有望成为一个预后判断的指标^[12-17]。那么,MICA分子在舌鳞癌脑高转移细胞Tca8113-Tb稳定过表达后,是否也会增加其从细胞表面脱落的几率而反过来抑制机体的免疫功能呢?对于这一问题,本课题组将进一步通过ELISA检测细胞培养上清的sMICA水平来予以验证。如果这一假设得到证实,如何采取措施来抑制或逆转这种脱落过程将是今后进

一步研究的重点。

[参考文献]

- [1] Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA[J]. Science, 1999, 285(5428) :727-729.
- [2] Stastny P. Introduction : MICA/MICB in innate immunity, adaptive immunity, autoimmunity, cancer, and in the immune response to transplants[J]. Hum Immunol, 2006, 67(3) :141-144.
- [3] Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, et al. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity :Role of the MICA-NKG2D system[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2007, 18(1/2) : 159-170.
- [4] Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class genes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(14) :6259-6263.
- [5] Wu J, Song Y, Bakker AB, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10[J]. Science, 1999, 285(5428) :730-732.
- [6] Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, et al. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity[J]. Nature, 2001, 413(6852) :165-171.
- [7] Kaiser BK, Yim D, Chow IT, et al. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands[J]. Nature, 2007, 447(7143) :482-486.
- [8] Wang X, Lundgren AD, Singh P, et al. An six-amino acid motif in the alpha3 domain of MICA is the cancer therapeutic target to inhibit shedding[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387(3) : 476-481.
- [9] Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases[J]. Cancer Res, 2008, 68(15) : 6368-6376.
- [10] Zhang C, Niu J, Zhang J, et al. Opposing effects of interferon-

- alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class chain-related A in tumors[J]. Cancer Sci, 2008, 99(6) :1279-1286.
- [11] Friese MA, Wischhusen J, Wick W, et al. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity *in vivo*[J]. Cancer Res, 2004, 64(20) :7596-7603.
- [12] Kato N, Tanaka J, Sugita J, et al. Regulation of the expression of MHC class -related chain A, B(MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells[J]. Leukemia, 2007, 21(10) :2103-2108.
- [13] Nückel H, Switala M, Sellmann L, et al. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia[J]. Leukemia, 2010, 24(6) :1152-1159.
- [14] Ma L, Li G, Su Y, et al. The soluble major histocompatibility complex class -related chain A protein reduced NKG2D expression on natural killer and T cells from patients with prolactinoma and non-secreting pituitary adenoma[J]. J Clin Neurosci, 2010, 17(2) :241-247.
- [15] Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class -related chain A(MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions[J]. BMC Cancer, 2008, 8 :16.
- [16] Holdenrieder S, Eichhorn P, Beuers U, et al. Soluble NKG2D ligands in hepatic autoimmune diseases and in benign diseases involved in marker metabolism[J]. Anticancer Res, 2007, 27(4A) : 2041-2045.
- [17] Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, et al. Soluble MICA in malignant diseases[J]. Int J Cancer, 2006, 118(3) :684-687.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第436页)

- [6] Masella RP, Dolan CT, Laney WR. The prevention of the growth of Candida on silastic 390 soft liner for dentures[J]. J Prosthet Dent, 1975, 33(3) :250-257.
- [7] Pigno MA, Goldschmidt MC, Lemon JC. The efficacy of antifungal agents incorporated into a facial prosthetic silicone elastomer[J]. J Prosthet Dent, 1994, 71(3) :295-300.
- [8] Saraç D, Saraç YS, Kurt M, et al. The effectiveness of denture cleansers on soft denture liners colored by food colorant solutions [J]. J Prosthodont, 2007, 16(3) :185-191.
- [9] 金宗哲. 无机抗菌材料及其应用[M]. 北京 : 化学工业出版社, 2004 : 102-122.

- Jin Zongzhe. Inorganic antimicrobial materials and applications[M]. Beijing : Chemical Industry Press, 2004 :102-122.
- [10] 胡涛, 王明丽, 吴建军, 等. 四针状氧化锌复合抗菌材料滤片抑菌和毒性作用的实验研究[J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(3) :273-274.
- Hu Tao, Wang Mingli, Wu Jianjun, et al. An experimental study on bacteriostasis and toxicity of needle-like zinc oxide antibacterial composite filters[J]. Chin J Dis Control Prev, 2005, 9(3) :273-274.

(本文编辑 胡兴戎)