

人高尔基体蛋白 GP73 基因的克隆、表达、单克隆抗体的制备及鉴定

徐 言¹, 曾晓燕², 张 晓³, 金 秋³, 张建平^{1*}, 焦永军^{2*}

(¹南京医科大学第二附属医院普通外科, 江苏 南京 210011; ²卫生部肠道病原微生物重点实验室, 江苏省疾病预防控制中心病原微生物研究所, 江苏 南京 210009; ³南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 高尔基体蛋白 73(Golgi protein 73, GP73)是新近发现的肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的重要血清学标志物。通过克隆、表达人 GP73, 制备抗 GP73 单克隆抗体并鉴定其特性。方法: 克隆 GP73 基因, 构建 GP73 原核表达载体 pComb3XSS-GP73, 诱导表达, 以 HisFF Trap 亲和层析柱纯化 GP73-6×His 重组融合蛋白。以该融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 制备抗 GP73 单克隆抗体。以间接法 ELISA 检测抗体效价; Western blot 鉴定抗体特异性; 免疫共沉淀法初步检测肝癌患者血清中 GP73 表达水平。结果: 成功表达并纯化了 GP73-6×His 重组蛋白; 获得 5 株稳定分泌抗人 GP73 单克隆抗体杂交瘤细胞株; 免疫共沉淀证实抗 GP73 单克隆抗体能与肝癌患者血清中 GP73 蛋白特异性结合, GP73 水平在肝癌患者血清中较正常人显著升高。结论: 成功制备了抗人 GP73 单克隆抗体, 为后期建立检测人 GP73 的双抗体夹心 ELISA 方法打下基础。

[关键词] GP73; 单克隆抗体; 肝细胞性肝癌; 肿瘤标志物

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-301-05

Cloning, expression and development of monoclonal antibody of human Golgi protein 73

XU Yan¹, ZENG Xiao-yan², ZHANG Xiao³, JIN Qiu³, ZHANG Jian-ping^{1*}, JIAO Yong-jun^{2*}

(¹Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; ²Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology, Ministry of Health, Institute of Pathogenic Microbiology, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009; ³Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To clone, express human Golgi protein 73 (GP73), develop and characterize the monoclonal antibody (mAb) against GP73, a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** GP73 gene was amplified by PCR, and cloned into prokaryotic expression vector pComb3XSS. The recombinant construct was expressed in Top10F' *E. coli* host, and purified with their fusion partner by HisFF Trap affinity chromatography. The recombinant protein was used to immunize the BALB/c mice for mAb development. The titer of the mAb was detected by ELISA and its specificity was analyzed by Western blot. The sera level of GP73 in HCC patients and healthy people was measured by co-immunoprecipitation (IP). **Results:** The GP73-6×His recombinant protein was successfully expressed and purified. Five hybridoma cell lines against GP73 were obtained. IP revealed that the mAb could combine with GP73 in human sera with high specificity. The level of GP73 in HCC patients is much higher than that of healthy people. **Conclusion:** The success in mouse a-GP73 mAb development provides the basis for further developing a sandwich ELISA for detection of human GP73.

[Key words] GP73; monoclonal antibody; HCC; tumor markers

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 301-305]

高尔基蛋白 73(Golgi protein 73, GP73)是新近发现的一个定位于高尔基体上的 II 型跨膜糖蛋白,

[基金项目] 江苏省卫生厅科研项目(H200814);江苏省卫生厅医学重点人才课题(RC2011082)

*通讯作者, E-mail: zhang_jp64@yahoo.com.cn; yongjunjiao@hotmail.com

由 400 个氨基酸组成, 相对分子量为 7.3×10^4 , 主要表达于人类多种组织的上皮细胞, 在正常的肝脏中, GP73 仅在胆管上皮细胞中表达, 肝细胞基本不表达, 但是在慢性肝炎、肝硬化及肝炎相关性肝癌等病变的肝组织中表达上调^[1]。GP73 被认为是一评估肝脏病损或肝纤维化的有效指标^[2]。在慢性肝

脏疾病中,患者血清 GP73 含量升高,特别是在早期肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)表现尤为显著,大量研究表明 GP73 可能是肝癌诊断的一个新的标志物^[3-5]。本研究通过构建 GP73 原核表达载体,诱导表达,纯化 GP73-6×His 重组蛋白,免疫 BALB/c 小鼠,利用杂交瘤融合技术制备鼠抗人 GP73 单克隆抗体,并初步鉴定抗体功能,分析血清 GP73 检测在 HCC 临床诊断中的应用价值。进而为下一步建立血清学方法检测 HCC 奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

菌株 *E.coli*. Top10F'、胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司;小鼠骨髓瘤细胞株 (Sp2/0)、质粒 pComb3XSS 由本室保存;弗氏完全佐剂和不完全佐剂、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、标准蛋白 Marker 购自美国 Fermentas 公司;各种限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司;四甲基联苯胺(TMB)显色液试剂盒购自美国 Thermo 公司;细胞培养基均为美国 Sigma 产品;引物由南京金斯瑞有限责任公司合成。

1.1.2 实验动物

实验动物 BALB/c 小鼠(6~8 周龄,雌性,清洁级)购自上海斯莱克实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 pComb3XSS-GP73 表达载体的构建

取新鲜手术切除肝癌标本,液氮运输,-70℃保存,TRIzol 法提取总 RNA,使用 AMV Reverse Transcriptase 试剂盒(美国 Promega 公司)合成 cDNA。PCR 扩增按常规方法进行,上游引物 P1 为 5'-CCGTGGCCAGCGGCCACACGGATCATGGAGCTGGAA-3',下游引物 P2 为 5'-CACGGCCGGCCTGGCCGAGTGTATGATTCCGCTTTTC-3',产物 1 083 bp,在 2 条引物的 5' 分别引入一个不对称的 *Sfi* I 酶切位点。PCR 产物用凝胶回收试剂盒回收,经测序无误后用 *Sfi* I 酶切,连接至 pComb3XSS 载体,并转化至大肠杆菌 *E.coli*. Top10F' 感受态细胞,接种于 LB 平板,含氨苄青霉素(Amp)100 mg/L。

1.2.2 GP73 融合蛋白的表达及纯化

挑单菌落接种于 10 ml LB 培养基(Amp,100 mg/L)中,37℃摇菌过夜,按 1:100 比例接种于新的

10 ml LB 培养基(Amp,100 mg/L)中,37℃摇菌过夜,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37℃诱导过夜后离心收集菌体。超声波破菌后离心,取上清进行 SDS-PAGE 电泳,Western blot 验证。将经 Western blot 鉴定阳性的克隆转接到 500 ml LB 培养基(Amp,100 mg/L),震荡培养 3 h 左右,使 *D*(600 nm)约为 0.9,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 37℃过夜。离心收集细菌,弃上清,沉淀用 Binding buffer 500 ml 重悬后超声,加 1% Triton X-100 乳化,离心后收集上清上 HisFF Trap 亲和层析柱。用 Elution buffer 洗脱目的蛋白,至基线为零,收集洗脱峰。将纯化的 GP73-6×His 重组蛋白稀释 10 倍后,进行透析复性,复性的尿素梯度依次为 4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mmol/L,最后以 20 mmol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl(pH7.5)溶液透析,测得蛋白浓度为 3.3 mg/ml 再进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 抗 GP73 单克隆抗体(mAb)的制备

取 6~8 周龄体重 18~20 g BALB/c 小鼠,将纯化的 GP73-6×His 重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂完全混合,充分乳化,经腹背部、皮下、肌肉多点注射,剂量为 100 μg/只,以后每隔 2 周,取同等剂量的抗原和等体积的弗氏不完全佐剂加强免疫 1 次,共计 3 次。第 3 次加强免疫 1 周后眼眶取血测其免疫效价,以间接 ELISA 检测小鼠血清抗 GP73 多抗的效价。效价高者尾静脉再冲击免疫 1 次,3 d 后进行细胞融合,同时眼部取血,离心分离血清备用。将生长状态良好的 Sp2/0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞以 1:10 的比例混合,加入 50%PEG 进行融合,最后用预先配制的 20%FBS-Opti-MEM-HAT-HCS 培养基,接种到 96 孔细胞培养板中培养,每孔 250 μl。HAT 培养液选择培养后改用 HT 培养液,间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞培养上清,一抗为细胞培养上清,二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:4 000 稀释),显色底物为 TMB,对阳性孔进行扩大培养后,采用有限稀释法对杂交瘤细胞进行克隆化培养,筛选出稳定分泌抗 GP73 抗体的杂交瘤细胞株,并进行扩增冻存。长期传代培养后,以相同的方法再次克隆化鉴定之。

1.2.4 mAb 的生物学特性分析和鉴定

1.2.4.1 mAb 的 Ig 亚类鉴定

取杂交瘤培养上清,按美国 Sigma 公司小鼠单克隆抗体亚型检测试剂盒说明,采用 ELISA 方法进行亚类测定。

1.2.4.2 mAb 特异性鉴定

将 GP73-6×His 重组蛋白用 12% SDS-PAGE 电泳后,转移至 NC 膜,脱脂奶粉(50 g/L)封闭,加入适当稀释的抗 GP73mAb,37℃ 孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (1:4 000 稀释),37℃ 孵育 1 h,洗涤,常规曝光,观察 GP73 抗原与抗 GP73mAb 的结合活性。

1.2.4.3 mAb 效价的检测

将杂交瘤细胞的培养上清和纯化 mAb 按梯度稀释,分别经间接 ELISA 法测定 mAb 的效价,以出现阳性反应的最高稀释度作为抗体的效价。

1.2.4.4 免疫共沉淀法初步测定肝癌患者血清中 GP73 的表达

分别取肝癌患者、健康人血清各 1 ml,加入 40 μl protein G,4℃ 混匀过夜。离心取上清液,加入 protein A、抗 GP73mAb 室温混匀 5 h,离心取沉淀,以 PBS 反复洗涤 3 次后重悬行 SDS-PAGE 和 Western blot。

2 结 果

2.1 重组质粒 pComb3XSS-GP73 的构建和鉴定

以 pComb3XSS-GP73 为模板,扩增的 GP73 片段全长 1 083 bp,与预期结果相符(图 1)。重组质粒经 *Sfi* I 进行双酶切,目的片段大小与预期相符(图 2)。pComb3XSS-GP73 转化后挑单菌落 PCR 验证。测序结果显示目标序列与 NCBI 相应序列相符,证实表达载体 pComb3XSS-GP73 构建成功。

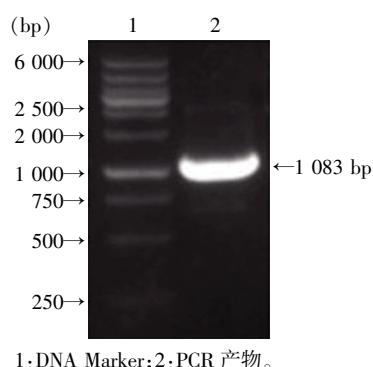
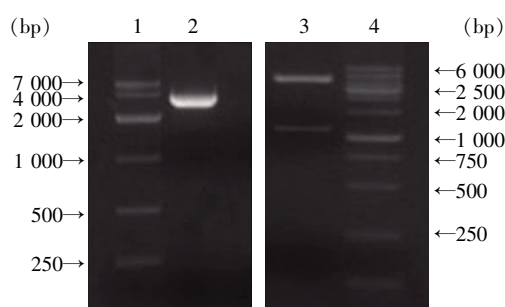


图 1 GP73 基因 PCR 产物的凝胶电泳结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of GP73 gene

2.2 GP73 蛋白的诱导表达及纯化

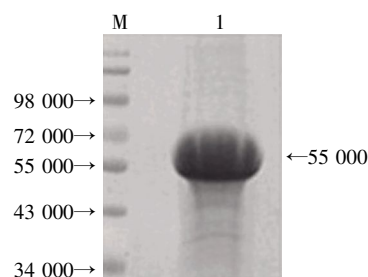
pComb3XSS-GP73 阳性菌株经 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 电泳显示:在 37℃、1 mmol/L IPTG 诱导过夜条件下,以 HisFF Trap 亲和层析柱纯化,SDS-PAGE 证实纯度在 80% 以上(图 3)。



1:DNA marker;2:pComb3XSS;3:pComb3XSS-GP73 重组质粒双酶切产物;4:DNA Marker。

图 2 pComb3XSS 和 pComb3XSS-GP73 的酶切鉴定

Figure 2 Restriction digestion of pComb3XSS and pComb3XSS-GP73 recombinant plasmids



M:蛋白 Marker;1:纯化后的 GP73 重组蛋白。

图 3 GP73 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of GP73 recombinant protein

2.3 细胞融合、筛选及克隆化

取免疫小鼠的脾细胞及 Sp2/0 骨髓瘤细胞 PEG 法融合,共分 12 块 96 孔板,细胞经 HAT、HT 选择性培养,细胞融合率约为 87%,当每孔杂交瘤细胞覆盖孔底 5%~30%时,采用间接 ELISA 法检测细胞培养上清中抗体的分泌情况。阳性克隆按有限稀释法进行克隆化培养,获得 5 株持续分泌特异性抗 GP73mAb 的杂交瘤细胞株分别命名为 3D5A10、8C4G5、5E2G6、7C8F4 和 7H3F5,经过 3 个月以上传代 5 株细胞株均能良好生长,并稳定分泌抗体。

2.4 抗体亚类、特异性鉴定及效价测定

应用单克隆抗体亚类检测试剂盒进行抗体亚类鉴定,其免疫球蛋白亚类重链分别为 IgG₁、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2a}、IgG₃,轻链均为 κ 型。Western blot 结果显示在 55 000 处出现一条抗原抗体结合带(图 4),证明此单抗特异性针对 GP73 重组蛋白。经间接 ELISA 测定,GP73 单克隆抗体的效价都达 1:10 000 以上(图 5)。

2.5 免疫共沉淀结果

免疫共沉淀结果显示制备的抗 GP73mAb 可以与肝癌患者血清中 GP73 蛋白特异性结合,并且 Western blot 初步结果提示血清中 GP73 蛋白水平在肝癌患者明显较正常人升高(图 6)。

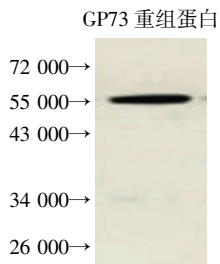


图 4 GP73 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Figure 4 Western blot analysis of the GP73 recombinant protein

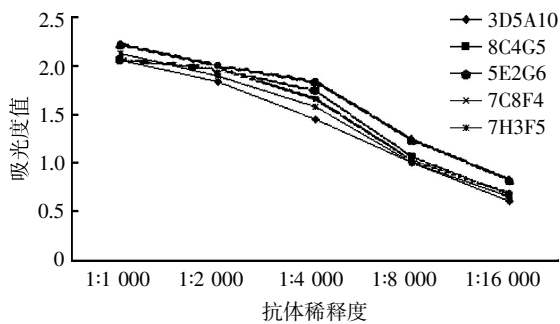
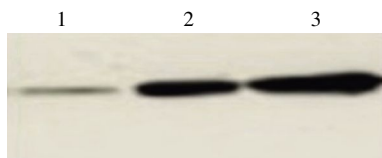


图 5 GP73mAb 效价测定

Figure 5 The titer of the GP73mAb



1:健康人血清;2,3:肝癌患者血清。

图 6 血清 GP73 免疫共沉分析

Figure 6 IP analysis of sera GP73

3 讨论

HCC 是最常见的恶性肿瘤之一,其发生率呈逐年上升的趋势,全球每年新发肝癌病例约 56 万,我国占 1/2 以上,为欧美国家的 5~10 倍。目前手术切除仍然是肝癌的主要治疗手段,但是接受根治性手术的肝癌患者 5 年生存率仅为 30%~40%^[6-7],因此早期正确的诊断对肝癌患者的预后起着决定性的作用。肝癌的诊断主要依靠血清肿瘤标志物检测、影像学和组织学检查。甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)虽为诊断 HCC 的首选指标,但其敏感性只有 50%~70%,特别是早期 HCC,AFP 敏感性仅 40%左右^[8-9]。故急需寻找一种敏感性更高、特异性更强的新肿瘤标志物,建立高效、便捷的检测方法,提高 HCC 的早期诊断率。

研究发现高尔基体不仅参与蛋白加工、细胞分化及细胞间信号转导,并在细胞凋亡中扮演重要角色,且其功能障碍可能与肿瘤的发生密切相关,其

中 GP73 是最值得期待的肿瘤标志物之一^[10]。编码 GP73 蛋白的基因位于第 9 号染色体,其 mRNA 约为 3.0 kb,含有一个开放阅读框。GP73 的 N-末端为带有一个信号肽剪切位点的单跨膜区,C-末端为胞外段,位于高尔基体的顺式面,是与其他蛋白质相互作用的主要功能区。由于定位于高尔基体膜上,因此在最初的研究中,采用免疫组化方法检测到 GP73 优先表达于胃、肠、前列腺等组织的上皮细胞中^[5]。在 GP73 的胞外区含 PC 剪切位点 R52VRR55,经 PC 剪切后从高尔基体释放并分泌到细胞外,从而进入外周血^[11]。

最近的研究发现,血清 GP73 在诊断 HCC 中其敏感性和特异性均优于 AFP^[12]。Gu、Hu、Mao 等^[13-15]分别报道 HCC 患者血清 GP73 水平显著高于正常人和其他疾病患者。李利军等^[16]研究发现 GP73 的表达与肝脏肿瘤组织的大小、分化程度、临床分期及血清 AFP 水平无明显关联,GP73、血管内皮生长因子(VEGF)和 AFP 3 种标志物的联合检测有助于 HCC 的诊断,特别是对于 AFP 阴性的 HCC 患者,GP73 和 AFP 具有互补性,联合检测可提高早期 HCC 的检出率^[17-18]。另有研究证实 GP73 在肝威尔逊病中普遍表达,并能触发炎症反应、肝脏纤维化及发育不良^[19]。此外,大量的文献报道 GP73 在前列腺癌、肺癌、肾癌、精原细胞瘤、Alzheimer's 病等患者体内高表达,并有望成为相应疾病早期诊断和预后监测的生物标志物^[20-24]。

本研究以 pComb3XSS 原核表达载体诱导表达 GP73-6xHis 重组蛋白,而原核表达体系缺少转录后修饰,蛋白在表达过程中可能不能进行有效的糖基化,并且可能在蛋白提取、纯化透析过程中没有得到完全复性,因此其诱导机体产生的主要是针对非糖基化和线性化表位的抗体。本研究最终获得 5 株持续稳定分泌抗 GP73 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,且效价都较高,该 5 株抗体与 GP73-6xHis 重组蛋白 Western blot 结果均显示特异性结合,人血清免疫共沉淀后的 Western blot 结果亦显示阳性,提示筛选到的抗体株可以与人血清中 GP73 天然表位特异性结合,且 GP73 水平在 HCC 患者血清中较健康人血清中升高。因 GP73 是一种定位于高尔基体上的 II 型跨膜糖蛋白,可存在多个糖基化位点,抗体株可能与其在非糖基化位点上出现特异性结合。相对于 Western blot 等方法,ELISA 具有敏感性更高、易于操作、结果可以客观定量并且可重复测定便于动态监测及费用相对低廉等优点,已被广泛应

用于临床多种肿瘤标志物的血清学检测。下一步,将应用已制备的鼠源抗GP73单克隆抗体建立可用于检测GP73的双抗体夹心ELISA方法,用于定量检测正常人、慢性肝炎、肝硬化、肝癌患者血清GP73水平,并与传统肝癌临床应用诊断标志物AFP、CA19-9、CA125等联合比较,以评估其在诊断早期肝癌中的确切价值。

综上所述,本研究通过原核表达GP73蛋白,成功制备了鼠抗人GP73单克隆抗体,为进一步开发GP73酶联免疫吸附试剂盒奠定了良好的基础。

[参考文献]

- [1] Kladney RD, Cui X, Bulla GA, et al. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease[J]. *Hepatology*, 2002, 35(6): 1431-1440
- [2] Maitra A, Thuluvath PJ. GP73 and liver disease: a (Golgi) complex enigma [J]. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(6): 1096-1098
- [3] Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 779-784
- [4] Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(6): 1007-1012
- [5] 赵秀英, 李 宁, 丁惠国, 等. 血清高尔基体糖蛋白73在肝细胞癌诊断中的作用[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(12): 943-946
- [6] Shariff MI, Cox IJ, Gomaa AI, et al. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 3(4): 353-367
- [7] Poon D, Anderson BO, Chen LT, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009 [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(11): 1111-1118
- [8] Kassahun WT, Fangmann J, Harms J, et al. Liver resection and transplantation in the management of hepatocellular carcinoma: a review[J]. *Exp Clin Transplant*, 2006, 4(2): 549-558
- [9] Miura N, Maruyama S, Oyama K, et al. Development of a novel assay to quantify serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA and its significance as a tumor marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Oncology*, 2007, 72(Suppl 1): 45-51
- [10] Mukherjee S, Chiu R, Leung SM, et al. Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton[J]. *Traffic*, 2007, 8(4): 369-378
- [11] Bachert C, Fimmel C, Linstedt AD. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Traffic*, 2007, 8(10): 1415-1423
- [12] Mao Y, Yang H, Xu H, et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2010, 59(12): 1687-1693
- [13] Gu Y, Chen W, Zhao Y, et al. Quantitative analysis of elevated serum Golgi protein-73 expression in patients with liver diseases [J]. *Ann Clin Biochem*, 2009, 46(Pt 1): 38-43
- [14] Hu JS, Wu DW, Liang S, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is sensibility and specificity for hepatocellular carcinoma of diagnosis in a hepatitis B-endemic Asian population [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(2): 339-345
- [15] 毛一雷, 杨华瑜, 徐海峰, 等. 新的肝癌血清标记物GP73在肝癌诊断中的初步研究 [J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(14): 948-951
- [16] 李利军, 李新丰, 王高雄. GP73联合AFP、VEGF检测对原发性肝癌的诊断价值 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009(29): 3056-3060
- [17] Riener MO, Stenner F, Liewen H, et al. Alpha-fetoprotein and serum golgi phosphoprotein 2 are equally discriminative in detecting early hepatocellular carcinomas [J]. *Hepatology*, 2009, 50(1): 326
- [18] Tian L, Wang Y, Xu D, et al. Serological AFP/ golgi protein 73 could be a new diagnostic parameter of hepatic diseases [J]. *Int J Cancer*, 2010, [Epub ahead of print]
- [19] Wright LM, Huster D, Lutsenko S, et al. Hepatocyte GP73 expression in Wilson disease [J]. *J Hepatol*, 2009, 51(3): 557-564
- [20] Cao D L, Yao X D. Advances in biomarkers for the early diagnosis of prostate cancer [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(2): 229-233
- [21] Zhang F, Gu Y, Li X, et al. Up-regulated Golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2) expression in lung adenocarcinoma tissue [J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(12): 983-991
- [22] Fritzsche FR, Riener MO, Dietel M, et al. GOLPH2 expression in renal cell cancer [J]. *BMC Urol*, 2008, 8: 15
- [23] Fritzsche FR, Kristiansen G, Riener MO, et al. GOLPH2 expression may serve as diagnostic marker in seminomas [J]. *BMC Urol*, 2010, 10: 4
- [24] Lin K, Tang M, Han H, et al. Association between the polymorphisms of CALHM1 and GOLPH2 genes and Alzheimer's disease [J]. *Psychiatr Genet*, 2010, 20(4): 190

[收稿日期] 2011-10-29