

陕西省猪瘟疫病毒流行毒株 E2 基因变异分析初报^{*}

马秋明¹, 张建安², 王 强³, 朱小甫¹, 王文江⁴, 何维明¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712106;

3 宜君县畜牧兽医中心, 陕西 宜君 727200; 4 咸阳市畜牧兽医站, 陕西 咸阳 712108)

[摘 要] 根据 GenBank 公布的猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV) Shimen 株全基因序列, 设计并合成 2 对引物, 用 RT-PCR 方法对采自陕西省部分地区的 30 份 CSF 病料中, CSFV 流行毒株的 E2 基因进行了扩增, 并将其克隆入 pMD18-T 载体, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。提取 pMD-18T-E2 重组质粒, 进行 BamH、Hind 双酶切鉴定, 并对阳性质粒进行测序, 将测序结果与 HCLV 疫苗株和 shimen 株 E2 基因及 E2 蛋白进行序列分析。结果表明, 从 30 份病料中共扩增到 10 株 CSFV 流行毒株的 E2 基因; 扩增的 10 株陕西 CSFV 流行毒株 E2 基因同源性为 92.3%~99.6%, 与 Shimen 株及 HCLV 疫苗株的同源性为 75.0%~79.4%; 10 株 CSFV 流行株 E2 蛋白的同源性为 90.0%~100%, 与 Shimen 株和 HCLV 疫苗株 E2 蛋白的同源性分别为 78.9%~84.4%和 77.8%~83.3%。说明所扩增的 10 株陕西 CSFV 流行毒株的 E2 基因发生了较大变异。

[关键词] 猪瘟疫; 流行毒株; E2 基因; 序列分析

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0019-05

Cloning and sequence analysis of E2 gene of ten CSFV strains in Shaanxi

MA Qiu-ming¹, ZHANG Jian-an², WANG Qiang², ZHU Xiao-fu¹,
WANG Wen-jiang³, HE, Wei-ming¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of traditional medicine of Shaanxi, Xianyang, Shaanxi 712106, China; 3 Department of Agriculture and Husbandry of Yijun, Yijun, Shaanxi 727200, China; 4 Station of Animal Science and Husbandry of Xianyang, Xianyang, Shaanxi 712039, China)

Abstract : Two pairs of special primers were designed and synthesized according to full sequences of CSFV Shimen strain published in GenBank. E2 gene of ten CSFV Shaanxi strains was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR product was cloned into pMD-18T vector, then transformed into *E. coli* DH5 α competent cells. The pMD-18T-E2 recombinant plasmid was extracted and the positive plasmid was sequenced after identified by digestion of BamH and Hind restriction enzyme. The results show that nucleotide homogeneity of E2 gene of ten CSFV Shaanxi strains is 92.3% - 99.6%. Nucleotide homogeneity of E2 gene of ten CSFV Shaanxi strain with E2 gene of Shimen and HCLV strain ranged from 75.0% - 79.4%. Amino acid homogeneity of E2 gene of ten CSFV Shaanxi strains is 90.0% - 100%, while 78.9% - 84.4% with Shimen strain and 77.8% - 83.3% with HCLV strain. The results suggested that mutation occurred in E2 gene of these ten CSFV Shaanxi strains.

Key words : classical swine fever; inflowence strain; E2 gene; sequence analysis

^{*} [收稿日期] 2006-03-11

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2003 KOZ-G11-O3)

[作者简介] 马秋明(1976-), 男, 陕西西安人, 研究实习员, 在读硕士, 主要从事动物疫病防治研究。

[通讯作者] 何维明(1964-), 男, 陕西临潼人, 研究员, 主要从事重大动物疫病防治研究。

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是严重危害养猪业的传染病之一,传染性很强,致死率较高,给养猪业造成巨大的经济损失,国际动物卫生组织早在 1984 年就将此病列为 A 类传染病之一^[1],我国也将其列为一类动物疫病。CSF 的病原为猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV),其基因组为单股正链 RNA,属于黄病毒科、瘟病毒属。CSFV 所有的结构蛋白(C(p14)、Erns(gp48)、E1(gp33)、E2(gp53))和非结构蛋白(Npro、P7、NS2-3(p125)、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)均由基因组中唯一的大开放阅读框(ORF)编码^[2]。在结构蛋白中,由 E2 基因编码的 E2 囊膜糖蛋白是最为重要的保护性抗原,其刺激机体产生的中和抗体是疫苗免疫保护力的物质基础^[3-4]。我国上世纪 50 年代研制成功的猪瘟兔化弱毒疫苗(HCLV 株),具有免疫猪只后产生抗体快、安全性高、免疫保护期长等优点,为我国猪瘟的防制作出了重大贡献^[5]。但近几年来,猪瘟兔化弱毒疫苗的免疫效果越来越差,慢性、非典型性猪瘟常常在免疫猪群中发生。究其原因,可能是长期使用疫苗免疫导致 CSFV 流行毒株处于强大的免疫压力下,从而使 CSFV 流行毒株逐渐向远离疫苗株的方向变异^[6-7]。因此,了解猪瘟病毒流行株的变异情况,对猪瘟流行病学及其防制研究具有重要意义。为了掌握当前陕西省 CSFV 流行株 E2 基因的变异情况,本试验对陕西省部分地区猪瘟的流行情况进行了调查,并对 CSFV 流行株 E2 基因进行了克隆和序列分析,以期为了解当前陕西 CSFV 流行株 E2 基因的变异态势提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 病料为疑患 CSF 猪的脾脏、肾脏、肝脏和淋巴结组织,共 30 份,其中 10 份采自西安市临潼区和长安区的 2 个猪场,15 份采自咸阳市泾阳县和礼泉县的 3 个猪场,5 份采自铜川市宜君县某猪场。

1.1.2 试剂 TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司,AMV 反转录酶(5 U/μL)、HPRI RNA 酶抑制剂(40 U/μL)、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、dNTP(2.5 mmol/L)、pMD18-T 载体克隆试剂盒、BamH (15 U/μL)和 Hind (15 U/μL)限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司,UNI-Q-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司, DH5α 大肠杆菌购自华美生物科技有限公司。

1.1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 上发表的 CSFV Shimen 株(GenBank 登录号为 AF092448)全基因序列,设计了 E2P1/E2P2 和 E2P3/E2P4 两对引物,引物序列如下。

E2P1: 5'-GTAAGTGGGGCACAAGG-3'(2423 ~ 2439 bp);

E2P2: 5'-TTATCACTATCAGCCACAGGACAT-3'(3524 ~ 3504 bp)。

E2P3: 5'-TCGACAACCAATGAGATAGGG-3'(2467 ~ 2487 bp);

E2P4: 5'-CACAGCCCAAATCCAAAATC-3'(2738 ~ 2716 bp)。

引物 E2P1/E2P2 和 E2P3/E2P4 由生工生物工程(上海)有限公司合成,预期扩增片段长度分别为 1102 和 272 bp。

1.2 CSF 流行病学调查

对陕西省部分地区(西安市、咸阳市及宜君县)的规模化猪场猪群,及农户散养猪只中 CSF 的发病情况,进行流行病学调查。

1.3 陕西省 CSFV 流行株 RNA 的提取

将病料组织采用常规方法充分研磨后离心收集上清液,-70℃保存备用。取各病料上清液各 250 μL,参照 TRIzol Reagent 试剂说明进行总 RNA 的提取,空气中自然干燥。同时分别用疫苗毒和灭菌水做阳性和阴性对照。

1.4 陕西省 CSFV 流行株 E2 基因的 RT-PCR 扩增

1.4.1 第一链 cDNA 的合成 核酸干燥后用 10.0 μL DEPC 处理水充分溶解,加入下游引物 E2P2 (25.0 μmol/L) 1.0 μL,置 65℃水浴 10 min,取出后立即冰浴 5 min,再分别加入 dNTP 4.0 μL,5 × AMV Buffer 4.0 μL,AMV 0.5 μL,HPRI RNA 酶抑制剂 0.5 μL,总体积 20.0 μL。42℃水浴反转录 90 min 后取出,备用。

1.4.2 PCR 反应 PCR 反应体系为 50 μL: cDNA 模板 4.0 μL,超纯水 34.0 μL,10 × PCR Buffer 5.0 μL,dNTP 4.0 μL,上、下游引物(25.0 μmol/L)各 1.0 μL,Taq DNA 聚合酶 1.0 μL。一扩 PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;94℃50 s,54℃60 s,72℃60 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。二扩取 10 倍稀释的一扩产物 4.0 μL 作为模板,PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;94℃30 s,58℃30 s,72℃45 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。反应完毕后取 5.0 μL PCR 产物进行 10 g/L

琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察并照相。

1.5 陕西省 CSFV 流行株 E2 基因的回收、克隆及测序

按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明回收纯化 PCR 产物,与 pMD18-T 载体连接,构建重组质粒 pMD-18T-E2。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂板、挑菌并进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的菌液扩大培养,碱裂解法小量提取重组质粒 pMD-18T-E2,进行 BamH 和 Hind 双酶切鉴定,并将正确的 pMD-18T-E2 送上海生工进行测序。

1.6 陕西省 CSFV 流行株 E2 基因与 E2 蛋白序列的比较分析

利用 DNASTar 软件将测序结果与 GenBank 中发表的 CSFV 代表毒株 HCLV (GenBank 登录号 AF091507) 和 shimen 株 (GenBank 登录号 AF092448) 分别进行核苷酸及推导的氨基酸序列同源性比较分析,并绘制系统发生树。

2 结果与分析

2.1 流行病学调查结果

CSF 在陕西省规模化猪场及农户散养的猪只中时常发生,以慢性、非典型性发病为主,且时常在免疫猪群发生。病猪初期体温稍升高(40~41 $^{\circ}$ C),结膜发炎,眼角有脓样分泌物,食欲不振,粪便闭结或成黑色干粪,寒战,行走时摇摆,容易倒下;后期下痢或粪中带血,皮肤苍白色,在腹部、两耳、四肢内侧皮肤有点状或弥漫状出血斑点。病猪迅速消瘦、衰弱,有时突然倒地出现痉挛等症状。病程长达 5~15 d,甚至更长。各年龄段猪只均可发病,但以 3 月龄或 90 日龄以下,特别 10 日龄以内的仔猪多见,育肥猪和种猪较少发病。发病率较低,死亡的多为仔猪,较大的猪一般能耐过。剖检死猪及濒死期病猪可见喉头粘膜充血;口腔粘膜有出血点,有时可见溃疡,上附灰白色或黄色的假膜;有的胃有出血点,可见溃疡,上附灰白色或黄色的假膜;回盲瓣和结肠上段部分出血坏死或有钮扣状溃疡,直肠粘膜有出血点,有时有溃疡;肠系膜淋巴结肿大出血,切面外翻;胆囊粘膜有出血点及溃疡;脾脏边缘有红色针尖状出血点,有的有梗死;心脏内外膜、喉、膀胱有小点出血,肾脏苍白色,并有点出血。慢性病猪的最显著病变是大肠粘膜,特别是回盲瓣附近有钮扣状溃疡。母猪感染常表现为产弱胎、死胎、木乃伊胎,有的胎儿产出后发生先天性震颤,共济失调。调查中还发

现,人们在进行猪瘟免疫接种时,使用的免疫剂量常常是疫苗推荐剂量的 2~3 倍,而在免疫失败发生猪瘟时,常用推荐剂量 5 倍以上的剂量进行紧急接种。这种不规范使用疫苗的做法是否与免疫失败有关,值得探讨。

2.2 陕西省 CSFV 流行株 E2 基因扩增结果

采用上述方法从 30 份病料上清液中成功扩增了 10 株 CSFV 流行毒株的 E2 基因片段,其长度为 272 bp (图 1),与预期结果相符,分别命名为 SX01、SX02、SX03、SX04、SX05、SX06、SX07、SX08、SX09 和 SX10。其中, SX01~SX03 株来自长安区, SX04 株来自临潼区, SX05 株来自泾阳县, SX06~SX09 株来自礼泉县, SX10 株来自宜君县。

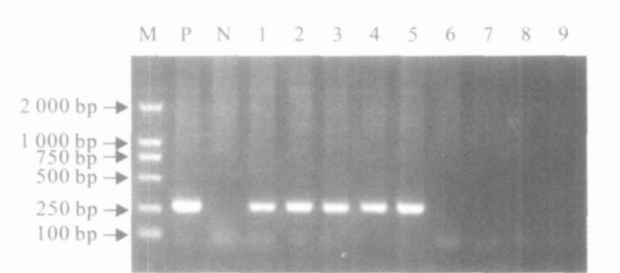


图 1 陕西省 CSFV 流行株 E2 基因 RT-PCR 扩增产物电泳结果(部分)
M. DL2000 DNA 分子质量标准;P. 阳性对照;N. 阴性对照;
1~5. 部分阳性病料 E2 基因扩增产物;6~9. 部分阴性病料扩增产物

Fig. 1 Result of PCR electropherogram of E2 gene of CSFV Shaanxi strain
M. DL2000 DNA marker; P. Positive control; N. Negative control;
1~5. Result of some positive; 6~9. Result of some negative

2.3 陕西省 10 株 CSFV 流行株 E2 基因核苷酸和 E2 蛋白氨基酸序列分析

用 DNASTar 软件分析 SX01~SX10 与 HCLV 株、Shimen 株的核苷酸和推导氨基酸序列的同源性。由表 1 可知,陕西省 10 株 CSFV 流行株 E2 基因核苷酸序列同源性为 92.3%~99.6%, SX02 与 SX03 及 SX07 与 SX08 同源性最高(为 99.6%), SX04 与 SX05 同源性最低(为 92.3%);陕西 10 株 CSFV 流行株与我国强毒 Shimen 株和疫苗毒 HCLV 株 E2 基因核苷酸序列同源性为 75.0%~79.4%,提示流行毒株 E2 基因无论与经典强毒株还是与疫苗株相比均发生了变异。由表 1 还可知,陕西省 10 株 CSFV 流行株 E2 蛋白氨基酸同源性为 90.0%~100%,其中 SX06 与 SX10 E2 基因推导氨基酸同源性最高(为 100%), SX04 与 SX05 同源性最低(为 90.0%);10 株 CSFV 流行株与 Shi-

men 和 HCL V 株 E2 蛋白氨基酸序列同源性分别为 78.9 %~84.4 %和 77.8 %~83.3 %。说明在氨基酸水平上 E2 蛋白也有明显的变异。与 HCL V 株 E2 蛋白主要抗原区相比,陕西 10 株 CSFV 流行毒株的 729 位氨基酸发生了 N →A 或 N →V 的变异,734 位氨基酸发生了 K →R 的变异。

表 1 陕西省 10 株 CSFV 流行株 E2 基因核苷酸序列及其推导氨基酸序列的同源性

Table 1 Homogeneity of nucleotide and deduced aminon acid sequence of E2 gene of ten CSFV strain from Shaanxi %

毒株名称 Strain	SX01	SX02	SX06	SX07	SX08	SX09	SX10	SX03	SX04	SX05	HCL V	Shimen
SX01		94.9	96.0	95.6	96.3	96.7	95.6	95.2	97.4	93.8	79.4	79.4
SX02	95.6		96.0	97.4	97.8	96.7	98.5	99.6	94.5	93.8	77.2	77.2
SX06	97.8	97.8		97.1	97.4	97.1	96.7	96.3	94.9	95.6	77.9	77.6
SX07	95.6	97.8	97.8		99.6	97.4	97.4	97.1	94.5	94.9	77.9	77.9
SX08	96.7	98.9	98.9	98.9		98.2	97.8	97.4	95.2	95.2	78.3	78.3
SX09	96.7	94.4	96.7	94.4	95.6		97.4	97.1	95.6	94.9	78.3	78.3
SX10	97.8	97.8	100.0	97.8	98.9	96.7		98.9	95.2	94.5	79.0	79.0
SX03	96.7	98.9	98.9	96.7	97.8	95.6	98.9		94.9	94.1	77.6	77.6
SX04	97.8	93.3	95.6	93.3	94.4	94.4	95.6	94.4		92.3	77.9	77.9
SX05	92.2	92.2	94.4	92.2	93.3	91.1	94.4	93.3	90.0		75.0	75.0
HCL V	83.3	81.1	83.3	81.1	82.2	82.2	83.3	82.2	82.2	77.8		98.5
Shimen	84.4	82.2	84.4	82.2	83.3	83.3	84.4	83.3	83.3	78.9	97.8	

注:右上部分为核苷酸序列同源性,左下部分为氨基酸序列同源性。
Note : The upper right of contents are the homogeneity of nucleotide sequence ,and the lower left of contents are the homogeneity of deduced aminon acid sequence.

2.4 陕西省 10 株 CSFV 流行株 E2 基因系统发生树分析

用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 功能,绘制陕西省 10 株 CSFV 流行株和 HCL V 株及 Shimen 株

的核苷酸系统发生树,结果见图 2。从图 2 可以看出,所比较的 12 个毒株明显分为两大支,10 株流行毒株组成一支,HCL V 株和 Shimen 株组成另一支,提示流行毒株和经典毒株亲缘关系较远。

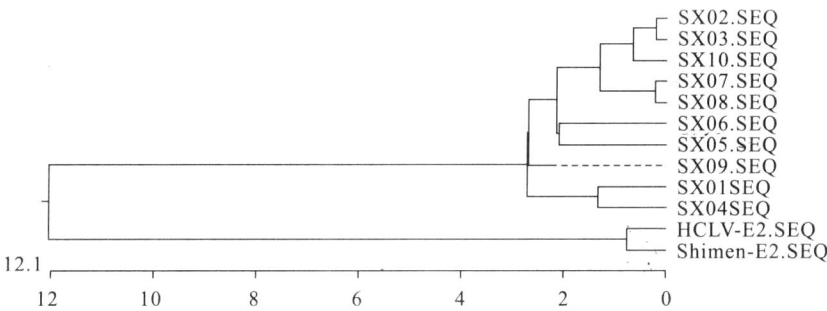


图 2 陕西省 10 株 CSFV 流行株和参考毒株 E2 基因系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree of E2 gene of ten CSFV Shaanxi strains and other reference strains

3 讨 论

CSF 是严重危害我国养猪业的一大传染病,常呈区域性流行或散发。CSF 在陕西省的发生一直未曾停止,而且经常在免疫猪群中发生(免疫失败),给养猪业造成巨大的经济损失。免疫失败的原因以往认为主要有以下两点:一是疫苗注射剂量不足;二是持续感染和先天感染。但作者认为,目前已基本不存在疫苗注射剂量不足的问题,因为在实际免疫接种时,人们接种的剂量常常是 CSF 疫苗推荐剂量的数倍。因此作者认为,导致免疫失败的更主要原因

可能是长期疫苗接种,使 CSFV 地方流行株处于强大的免疫压力下,从而使 CSFV 流行毒株逐渐在向远离疫苗株的方向变异。有研究表明,我国 CSFV 流行毒株 E2 基因发生了较大变异^[6-7]。由于 E2 蛋白是 CSFV 的主要保护性抗原,能诱导机体产生保护性中和抗体,流行毒株 E2 基因的变异可能导致 E2 蛋白抗原性的改变,从而影响疫苗的免疫效果。因此研究 E2 基因核苷酸序列和 E2 蛋白氨基酸序列的变异情况,对研究 CSFV 流行毒株的变异趋势

具有重要意义^[8-9]。本试验对陕西省部分地区 CSFV 流行株 E2 基因核苷酸和 E2 蛋白氨基酸序列的变异情况进行了研究,结果发现,所克隆的 10 株 CSFV 流行毒株 E2 基因核苷酸序列同源性为 92.3 %~99.6 %,氨基酸序列同源性为 90.0 %~100 %,与疫苗毒 HCLV E2 基因同源性为 75.0 %~79.4 %,氨基酸序列同源性为 77.8 %~83.3 %。说明,所克隆的 10 株 CSFV 流行毒株 E2 基因与疫苗株亲缘关系较远,发生了变异。

Van 等^[10]研究表明,CSFV E2 蛋白 705,710,713,729 和 734 位的氨基酸变异会导致流行毒株发生免疫逃逸。HCLV 疫苗株 E2 蛋白在上述 5 个位点的氨基酸分别为 N、L、G、N 和 K。本研究 10 株 CSFV 流行毒株与 HCLV 株 E2 主要抗原区相比,其中 729 位发生了 N→A 或 N→V 变异,734 位发生了 K→R 变异,这 2 个位点的变异对流行毒株的致病性以及疫苗的免疫保护作用有多大程度的影响,尚需进一步研究。

由于各种原因,本研究的采样范围还不够大,样本数量还不足够多,因此要完全反映陕西省 CSFV 流行株 E2 基因的变异情况,还需扩大采样范围及样本数量,进行更进一步的研究。

[参考文献]

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1997.

[2] Meyers G,Rumenapf T,Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus[J]. Virology,1989,171:555-567.

[3] Van Rijin P A. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia[J]. Veterinary Microbiology,1992,33:212-230.

[4] Stark R,Rumenapf G,Meyer ,et al. Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins[J]. Virology,1990,174:286-289.

[5] 仇华吉,童光志,沈荣显. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾[J]. 中国农业科学,2005,38(8):1675-1685.

[6] 赵耘,王在时,王琴,等. 23 株猪瘟病毒 E2 基因主要抗原编码区序列差异分析[J]. 中国兽医科技,2002,32(3):3-7.

[7] 李明晖,刘湘涛,韩雪清,等. 4 株猪瘟流行野毒株病毒结构蛋白 E2 基因的核苷酸序列分析[J]. 中国兽医科技,2001,31(5):8-10.

[8] Lowings J P,Paton D J,Sands J J ,et al. Classical swine fever: genetic detection and analysis of differences between virus isolates[J]. J Gen Virol,1994,75:3461-3468.

[9] Lowings P,Ibata G,Needham J ,et al. Classical swine fever virus diversity and evolution [J]. J Gen Virol,1996,77:1311-1321.

[10] Van Rijin P A, Van Gennip H G P,Demeijer E J ,et al. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus stain Brescia [J]. J Gen Virol,1993,74(10):2053-2066.

(上接第 18 页)

[4] 史明,游思维. 嘌呤类物质在中枢神经系统损伤中的作用[J]. 中华创伤杂志,2005,21(3):236-239.

[5] Sharma S P,Kaur J , Rattan S I. Increased longevity of kinetinfed *Zaprionus* fruitflies is accompanied by their reduced fecundity and enhanced catalase activity[J]. Biochem Mol Biol Int,1997,41(5):869-875.

[6] Sharma S P,Kaur J ,Rattan S I. Plant growth hormone kinetin delays ageing,prolongs the lifespan,and slows down development of the fruitfly *zaprionus paravittegei*[J]. Biochem Biophys Res Commun,1995,216(3):1067-1071.

[7] Rattan S I,Clark B F. Kinetin delays the onset of ageing characteristics in human fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun,1994,201(2):665-672.

[8] 张黎,欧阳五庆,胡颖,等. 玉米幼芽提取物对家蚕抗氧化损伤作用的影响[J]. 蚕业科学,2005,31(4):458-462.

[9] 刘玉梅,欧阳五庆,杨戈,等. 玉米幼芽提取物对 D-半乳糖致果蝇脂质过氧化反应的拮抗作用[J]. 中国临床康复,2006,35(10):112-114.

[10] 李迟,于东宁. 烧伤面积和深度的诊断[J]. 中国全科医学,2001,4(4):262-264.

[11] Nirankari V S, Vama S D,Lakhanpal V ,et al. Superoxide radical scavenging agents in treatment of alkali burns-an experimental study[J]. Arch Ophthalmol,1981,99:886-887.

[12] Ishizaki M,Shimoda M, Wakamatsu K,et al. Stromal fibroblasts are associates weth collagen IV in scar tissues of alkali-burned and lacerates corneas[J]. Curr Eye Res,1997,16:339-348.

[13] 李纳. 抗氧化物质与角膜碱烧伤[J]. 眼科,2002,11(4):243-246.

[14] 舒立涛,徐宝顺. 伤口湿性愈合的新理念[J]. 中国实用美学和整形外科学杂志,2004,15(6):336.

[15] Barciszewski J,Rattan S I S,Siboska G ,et al. Kinetin-45years on[J]. Plant Science,1999,148:37-45.

[16] Verbeke P,Siboska G E,Clark B F ,et al. Kinetin inhibits protein oxidation and glycoxidation in vitro[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2000,276(3):1265-1270.