

人源 SPINK6 在大肠杆菌中的表达优化

郑戎秉¹, 李 旦¹, 沈佳怡¹, Ulf Meyer-Hoffert², 吴志宏^{1,2}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 德国基尔大学 医学院皮肤学研究所, 德国 基尔 24105)

摘 要: 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 型 6 (serine protease inhibitor Kazal-type 6, SPINK6) 蛋白是医学上的重要蛋白。为了高效制备具有生物活性的 SPINK6 蛋白, 使用大肠杆菌表达系统重组表达 SPINK6 蛋白, 经过纯化和酶切后测定了其生物活性, 并对其表达条件进行了优化。结果表明, 飞行时间质谱测得产物的分子量为 6 061.51 Da, 通过此法成功制备获得了重组 SPINK6 蛋白, 并且重组 SPINK6 蛋白对激肽释放酶相关肽酶 5 (kallikrein-related peptidase 5, KLK5) ($K_i = 3.02 \pm 0.26$ nmol/L) 和 KLK14 ($K_i = 1.85 \pm 0.05$ nmol/L) 有较强的抑制作用, 具有生物活性。采用 pE-SUMO3 质粒为载体, 在菌体 OD₆₀₀ = 0.4 时加入 1 mmol/L 异丙基-β-D 硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导表达 3 h, 重组 SPINK6 蛋白获得最大表达量, 1 L 培养液中获得重组 SPINK6 3.32 mg。研究结果可为 SPINK6 蛋白功能及应用研究提供操作性强的制备方法和稳定的蛋白来源。

关键词: 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal 型 6; 激肽释放酶相关肽酶; 重组表达

中图分类号: Q812 文献标志码: A 文章编号: 1671-8798(2020)06-0516-07

Optimization of human SPINK6 expression in Escherichia coli

ZHENG Rongbing¹, LI Dan¹, SHEN Jiayi¹, Ulf Meyer-Hoffert², WU Zhihong^{1,2}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Department of Dermatology, University-Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, 24105 Kiel, Germany)

Abstract: Serine protease inhibitor Kazal-type 6 (SPINK6) is a kind of medically important protein. In order to effectively prepare SPINK6 with biological activity, SPINK6 was expressed recombinantly through Escherichia coli expression system. Its biological activity was determined after purification and enzyme digestion, and the expression conditions were optimized. The results show that the relative molecular mass of the protein is 6 061.51 Da measured by time of flight mass spectrometry, and the recombinant SPINK6 protein is therefore successfully prepared by this method. Moreover, the

收稿日期: 2020-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673048)

通信作者: 吴志宏(1966—), 男, 浙江省温州人, 研究员, 博士, 主要从事天然免疫和抗菌肽研究。E-mail: zhihong.wu@zust.edu.cn。

recombinant SPINK6 boasts high inhibitory effects against KLK5($K_i=3.02\pm0.26$ nmol/L) and KLK14($K_i=1.85\pm0.05$ nmol/L), thus being biologically active. Maximal recombinant SPINK6 production amounts to 3.32 mg/L achieved by using pE-SUMO3 as a vector and adding 1 mmol/L IPTG at thallus $OD_{600}=0.4$ for 3 h. This study optimizes the preparation method of SPINK6 with high operability, which might provide stable resources of SPINK6 for further focus on its functions and applications.

Keywords: SPINK6; KLKs; recombinant expression

激肽释放酶相关蛋白酶(kallikrein-related peptidases, KLKs)是一类丝氨酸蛋白酶,代表胰蛋白酶活性和胰凝乳蛋白酶活性的一个最大的蛋白酶家族^[1]。KLKs 由颗粒层中的角质形成细胞而产生,然后释放到颗粒层和角质层的间隙中^[2]。Pampalakis 等^[3]发现在健康皮肤中表达的 KLKs 至少有 8 种,在表皮发挥关键作用的是 KLK5、KLK7、KLK8 和 KLK14。其中 KLK5 和 KLK7 参与角质层蛋白水解,从而作用于皮肤的脱屑过程^[4]。

丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor Kazal-type, SPINKs)动态调控 KLKs 的活性以维护皮肤正常的屏障功能^[5]。目前已发现 3 个对 KLKs 有选择性抑制作用的 SPINKs 成员,即 SPINK5、SPINK6 和 SPINK9^[6]。Chavanas 等^[7]的研究发现,SPINK5 的基因突变会导致 KLK5 和 KLK7 的活性失调,从而引发内瑟顿综合征,并表现出特应性皮炎样症状。SPINK9 既是 KLK5 的选择性抑制剂,又是一种大肠杆菌选择性抗菌肽^[8,9]。SPINK6 是 KLKs 的选择性抑制剂,主要影响人类皮肤中最重要的 3 种 KLKs,即 KLK5、KLK7 和 KLK14^[6],是医学上重要的丝氨酸蛋白酶抑制剂。Toillon 等^[10]的研究发现,SPINK6 在睾丸、大脑和甲状腺等各种组织和器官中均有分布,其生物活性可能不止作用在皮肤上。Lu 等^[11]使用真核表达系统生产 SPINK6 蛋白,产量达到 12.5 mg/L,但由于所表达的 SPINK6 不带标签,对后续的纯化过程造成一定的困难,而且胞外表达的 hSPINK6 易被降解^[12]。

综上所述,SPINK6 蛋白具有重要的医学研究与应用价值。然而,由于 SPINK6 蛋白难以从皮肤中大量分离,其功能和分子作用机制的研究受到了限制。本研究使用大肠杆菌表达系统高效表达重组 SPINK6 蛋白,效率高、成本低,为进一步推进 SPINK6 蛋白的研究和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂

pE-SUOM3 质粒和 SUMO 蛋白酶 2 均购自艾美捷科技有限公司;Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物技术有限公司;大肠杆菌感受态 TOP10、BL21(DE3)plysS 购自北京全式金生物技术有限公司;高保真 DNA 聚合酶(PrimerStar HS)购自 TaKaRa 公司;逆转录酶(Superscript II RNaseH)购自德国 Invitrogen 公司;限制性核酸内切酶 *Bsa* I 和 *Bam* H I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;镍柱(His-Trap FF)购自 GE Healthcare 公司;C8 柱购自德国 Macherey-Nagel 公司;C4 柱(Jupiter-5 μ -C4-300A)柱购自德国 Phenomenex 公司;其余试剂为国产分析纯。

1.2 设备与仪器

蛋白纯化系统(GEÄKTA Pure 25 L1),美国通用电气公司;液相制备色谱(LC-8A),日本岛津公司;飞行时间质谱仪(G2-XS QTof),美国沃特世公司;台式冷冻离心机(Microfuge 20R),美国贝克曼公司;基因扩增仪(TC-96),杭州博日科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 pE-SUMO3-SPINK6 重组表达质粒的构建

用 TRizol 总 RNA 抽提试剂盒从人包皮培养的角质形成细胞中分离总 RNA。以 2 μ g 总 RNA 作为模板,逆转录获得 SPINK6 基因的转录本。用 SPINK6 特异性引物(上游引物 5'-ACTCAGGAAAG-

CAG-3',下游引物 5'-TGGCAAGTCACAAGAACA-3')进行 PCR 扩增,产物用质量分数为 2%的琼脂糖凝胶分离并测序。将反应混合物稀释 50 倍,进行进一步的 PCR 试验,用引物(上游引物 5'-AAG-GTCTCAAGGTCATCACCATCATCATCACCATCACCAGGGAGGACAGGTTGACTGT-3',下游引物 5'-AAGGATCCTCAATGGTGATGATGATGGTGATGATGGCATTTCAGGATGCTTTAG-3')进行扩增,引入 *Bsa* I 和 *Bam* H I 酶切位点,产物用质量分数为 2%的琼脂糖凝胶分离。用 *Bsa* I 和 *Bam* H I 酶对聚合酶链式反应产物和 pE-SUMO3 质粒进行双酶切,回收酶切产物,用 T4 连接酶在 16 °C 下连接过夜。将连接好的重组质粒转化到大肠杆菌感受态 TOP10 菌株中培养,扩增质粒后提取质粒测序确认。

1.3.2 pE-SUMO3-SPINK6 重组融合蛋白的表达

将重组质粒 pE-SUMO3-SPINK6 导入大肠杆菌感受态 BL21(DE3)plysS 中,挑选含有卡那霉素(50 mmol/L)和氯霉素(34 mmol/L)的平板上生长的阳性单菌落,接种到含有卡那霉素(50 mmol/L)和氯霉素(34 mmol/L)的 LB 培养基中培养。当菌体富集到一定浓度(用 OD_{600} 检测)时,加入异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导其表达蛋白。诱导表达结束后,将菌悬液于 4 °C, 5 000 g 离心 5 min,收集菌体沉淀,加入蛋白酶抑制剂,超声波破碎后 4 °C, 13 500 g 离心 45 min,保留上清液,于-80 °C 冰箱保存。

1.3.3 Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化

取出蛋白样品,冰上化冻后用 0.45 μ m 滤膜过滤,用镍柱进行 Ni^{2+} -NTA 亲和层析。洗脱体系为流动相 A(20 mmol/L 磷酸钠,0.5 mol/L 氯化钠,20 mol/L 咪唑,pH 7.4)和流动相 B(20 mmol/L 磷酸钠,0.5 mol/L 氯化钠,500 mol/L 咪唑,pH 7.4),流速为 1.0 mL/min。设置洗脱条件如下:平衡柱子 5 min,0%流动相 B;进样 10 min,0%流动相 B;清洗 10 min,0%流动相 B;洗脱 15 min,流动相 B 由 0%升至 100%;再生 5 min,100%流动相 B。检测在 280 nm 波长处的吸光度,收集出峰位置的蛋白,于-80 °C 冰箱保存。

1.3.4 RP8-HPLC 纯化

对经 Ni^{2+} -NTA 纯化的收集峰,调整 pH 值为 2~3,用 0.45 μ m 滤膜过滤。洗脱体系为流动相 A(0.05%三氟乙酸(TFA))和流动相 B(乙腈中加入 0.05% TFA),流速为 3.0 mL/min。设置洗脱条件如下:平衡柱子 10 min,10%流动相 B;进样 10 min,10%流动相 B;第一步洗脱 25 min,流动相 B 由 10%升至 60%;第二步洗脱 5 min,流动相 B 由 60%升至 100%;再生 5 min,100%流动相 B。检测在 215 nm 波长处的吸光度,收集出峰位置的蛋白,ESI-MS 鉴定后冷冻干燥,-80 °C 冰箱保存。

1.3.5 pE-SUMO3-SPINK6 重组融合蛋白的酶切

用 SUMO 蛋白酶 2 消化 pE-SUMO3-SPINK6 重组融合蛋白切下 SUMO3-His 标签。在 4 °C 下,用 80 μ L SUMO 蛋白酶 2 缓冲液(0.2 μ g SUMO 蛋白酶 2,0.3 mg 二硫苏糖醇,1 mL 磷酸缓冲液(1 \times PBS),pH 7.4)分别消化 100 μ g 重组融合蛋白 2、6、10 h。

1.3.6 SDS-PAGE 蛋白电泳

在蛋白样品中加入上样缓冲液,于 100 °C 金属浴加热 5 min 变性,吸取 20 μ L 样品上样,用 12% PAGE 胶进行电泳分离(70 V,30 min;100 V,90 min)。置于考马斯亮蓝 R-250 染色液中染色 3 h,随后用脱色液(75 mL 乙酸,50 mL 甲醇,875 mL 双蒸水)脱色直至蓝色背景褪去,有清晰的条带出现。

1.3.7 RP4-HPLC 纯化

酶消化后的混合物经过短暂离心后,将上清液用 C4 柱纯化。洗脱体系为流动相 A(0.1% TFA)和流动相 B(乙腈中加入 0.1% TFA),流速为 0.5 mL/min。设置洗脱条件如下:平衡柱子 10 min,10%流动相 B;进样 10 min,10%流动相 B;第一步洗脱 20 min,流动相 B 由 10%升至 60%;第二步洗脱 10 min,流动相 B 由 60%升至 100%;再生 5 min,100%流动相 B。检测 215 nm 波长处的吸光度,收集每个出峰位置的组分。

1.3.8 ESI-MS

用电喷雾离子质谱仪(Electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)鉴定经纯化后的蛋白。选择正电离模式,用碘化钠校正,将蛋白用体积分数为 50% 的乙腈溶液稀释 10 倍后以流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注入质谱仪,在 m/z 范围为 280~2 000 内扫描 3 min,得到样品的质核比图谱,用最大熵反褶积法得到样品的质谱图谱。

1.3.9 重组 SPINK6 的活性检测

在 KLK5 和 KLK14 中加入不同摩尔浓度的 hSPINK6,在缓冲体系(0.1 mol/L Tris 盐酸盐,150 mmol/L 氯化钠,5 mmol/L EDTA,0.05% 吐温 20, pH 8.0)中孵育 5 min。孵育后,在相同缓冲液中加入底物溶液,底物为 N-(p-Tosyl)-Arg-Gly-Val 5-NA,控制酶的终摩尔浓度为 2 nmol/L。使用酶标仪测量 405 nm 波长处的吸光度来监测反应的进展,通过线性回归确定不同 SPINK6 浓度的初始反应速度。根据莫里森紧密结合抑制模型分析,确定抑制常数 K_i 和标准误差。

1.3.10 SPINK6 重组蛋白表达条件的优化

用单因素分析方法对 SPINK6 蛋白表达的最适条件进行探究。探究最佳的表达质粒,分别选用 pET-32a、pET-SUMO 和 pE-SUOM3 质粒构建的表达质粒导入大肠杆菌进行表达^[6,13]。探究最佳表达初始菌体浓度,在菌液 OD₆₀₀ 分别为 0.1、0.2、0.4、0.6 时加入 IPTG 诱导表达。探究 IPTG 的最适诱导浓度,分别在 0.3、0.7、1.0、1.5、2.0 mmol/L 的 IPTG 摩尔浓度诱导下表达。探究最适表达时间,分别表达 1、2、3、4、5 h。以上表达完成后分别提取胞内蛋白进行 Ni²⁺-NTA 和 RP8-HPLC 两步纯化,然后用 SDS-PAGE 分离。使用 ImageJ 计算目标蛋白的总灰度值,采用 SPSS 22.0 对其进行差异性分析。

2 结果与讨论

2.1 pE-SUMO3-SPINK6 重组表达质粒的构建与鉴定

为了得到 SPINK6 的重组表达质粒,我们将 SPINK6 的片段进行了扩增并插入 pE-SUMO3 中。由图 1(a)和测序结果可知,SPINK6 转录本成功从人包皮角质形成细胞总 RNA 中扩增得到,长度为 322 碱基对(base pair, bp)。为了将得到的目的片段连接到载体 pE-SUMO3 的 *Bam*H I 和 *Bsa* I 之间,我们以上述产物为模板,由图 1(b)成功扩增得到了引入 *Bsa* I 和 *Bam*H I 这两个酶切位点的插入片段,测序结果可知其长度为 241 bp。大肠杆菌 TOP10 菌株中扩增的质粒测序结果显示插入片段成功连入质粒的阅读框架中。

2.2 SPINK6 重组融合蛋白的表达与纯化

为了重组表达 SPINK6 融合蛋白,我们将构建好的表达质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 中,在 IPTG 诱导下进行了表达。SDS-PAGE 检测结果表明在约 20 千道尔顿(kilo Dalton, kDa)和 24 kDa 处有 2 条较强蛋白条带(结果未显示),阴性对照在相应的位置无蛋白条带。随后,我们对细胞裂解液进行了 2 步分离纯化。图 2(a)显示了 Ni²⁺-NTA 纯化的洗脱曲线,随着流动相 B 的增加,在 22~30 min 获得 1 个洗脱峰,在 Ni²⁺-NTA 纯化过程中,大多数杂质直接流穿,而 SPINK6 重组融合蛋白因带有 His 标签而保留在柱上,因此分析该峰为 SPINK6 重组融合蛋白的洗脱峰。如图 2(b)显示,出峰产物通过进一步的制备 RP8-HPLC 纯化,在 38~42 min 得到 1 个洗脱峰,反相高效液相色谱是通过物质的不同极性将物质分离, Ni²⁺-NTA 纯化后留下了 SPINK6 重组融合蛋白和咪唑等盐类物质,咪唑等盐类物质极性较大先被洗脱下来,而 SPINK6 重组融合蛋白极性较小,后被洗脱下来,因此分析 38~42 min 的峰为 SPINK6 重组融合蛋白的洗脱峰。

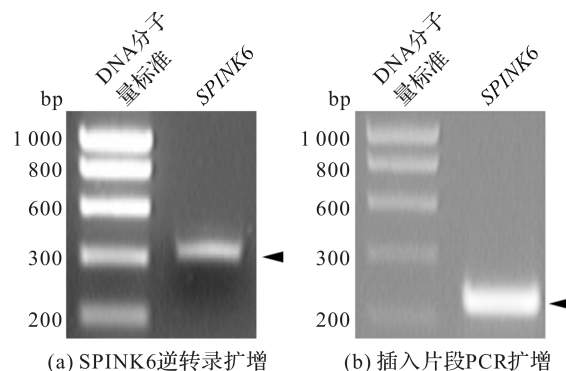


图 1 SPINK6 基因的转录本扩增

Fig. 1 Amplification of SPINK6 transcript

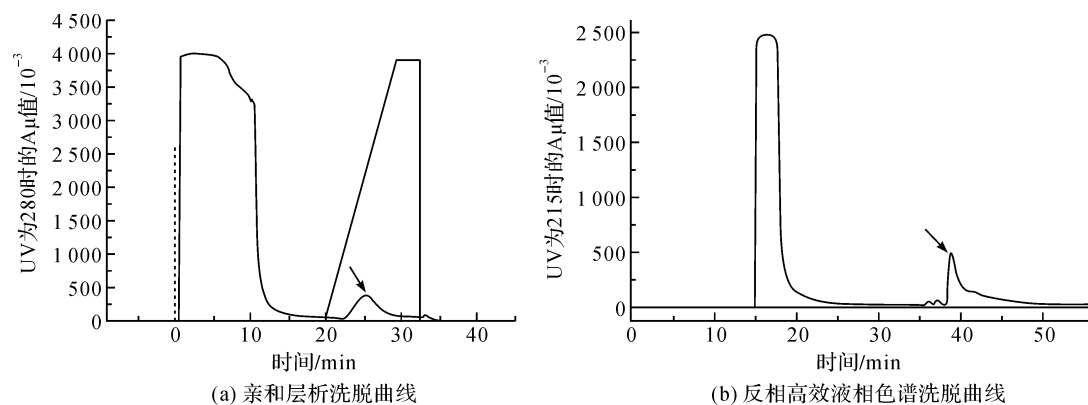


图 2 SPINK6 重组蛋白的纯化

Fig. 2 Purification of recombinant SPINK6

2.3 SPINK6 重组融合蛋白的酶切和鉴定

为获得 SPINK6 重组蛋白,4 ℃ 下酶切 10 h 时重组融合蛋白被完全消化,由图 3 (a)可知产生约 11 kDa 和 6 kDa 的两个条带,分别对应接头蛋白和目的蛋白。进一步对酶切产物进行 RP4-HPLC 纯化分析,洗脱峰进行 ESI-MS 检测,其 m/z 值分布在 758.73 至 1 516.20 之间(结果未显示)。通过最大熵反褶积得到了如图 3(b)所示的分子量图谱,显示酶切后的产物分子量为 6 061.51 Da。该分子量同预期的 SPINK6 理论分子量 6 067.83 Da 相比,少了 6.32 Da,这对应 6 个 H 原子的质量总和,这表明表达的 SPINK6 重组蛋白带有 3 个二硫键^[4]。

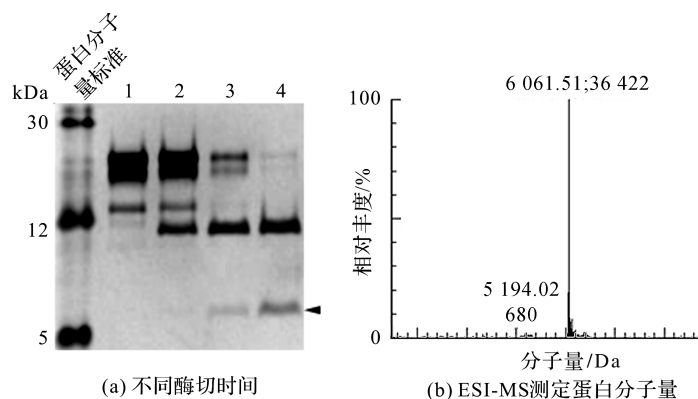


图 3 SPINK6 重组蛋白的酶切与鉴定

Fig. 3 Enzyme digestion and identification of recombinant SPINK6

2.4 重组 SPINK6 的活性鉴定

由于重组 SPINK6 蛋白已经带有 3 个二硫键,具备天然 SPINK6 的蛋白构象。为进一步探究重组 SPINK6 的抑制活性,我们用 KLK5 和 KLK14 测试了 SPINK6 的抑制效果。由图 4 可知,重组 SPINK6 对 KLK5 和 KLK14 的抑制常数分别为 (3.02 ± 0.26) nmol/L 和 (1.85 ± 0.05) nmol/L,对 KLK5 和 KLK14 有较强的抑制作用,这说明通过此方法表达的重组 SPINK6 具有良好的活性,在极微量的浓度下就起到抑制作用。

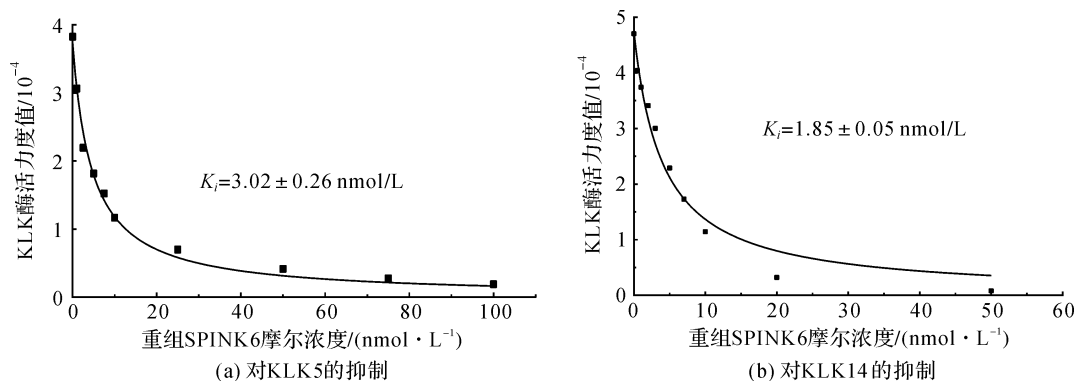


图 4 重组 SPINK6 对 KLKs 反应活性的抑制

Fig. 4 Inhibition of KLKs activity by recombinant SPINK6

2.5 SPINK6 重组融合蛋白表达的优化

为了寻找 SPINK6 融合蛋白重组表达的最适条件,我们设计了 4 个单因素试验以探究其最适表达条

件。由图 5(a)可知,在 pET-32a、pET-SUMO 和 pE-SUOM3 这三种表达质粒中,通过 pE-SUMO3 表达 SPINK6 重组融合蛋白,产量最高($P<0.05$)。由图 5(b)可知,在 OD_{600} 分别为 0.1、0.2、0.4 和 0.6 时加入 IPTG 开始诱导表达,其中 OD_{600} 为 0.4 时加入 IPTG 开始表达,产量最高($P<0.05$)。分别用 0.3、0.7、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 SPINK6 重组融合蛋白,由图 5(c)可知,在 IPTG 摩尔浓度为 1 mmol/L 诱导时,产量达到最高($P<0.05$)。加入 IPTG 分别诱导表达 1、2、3、4、5 h,收集表达产物,由图 5(d)可知,表达 3 h 后收集的产物蛋白量最高($P<0.05$)。综上所述,使用 pE-SUMO3 质粒,在 $OD_{600}=0.4$ 时加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达 3 h,为 SPINK6 重组融合蛋白表达的最适条件。通过上述方法表达及酶切纯化,我们在 1 L 培养液中获得重组 SPINK6 3.32 mg。

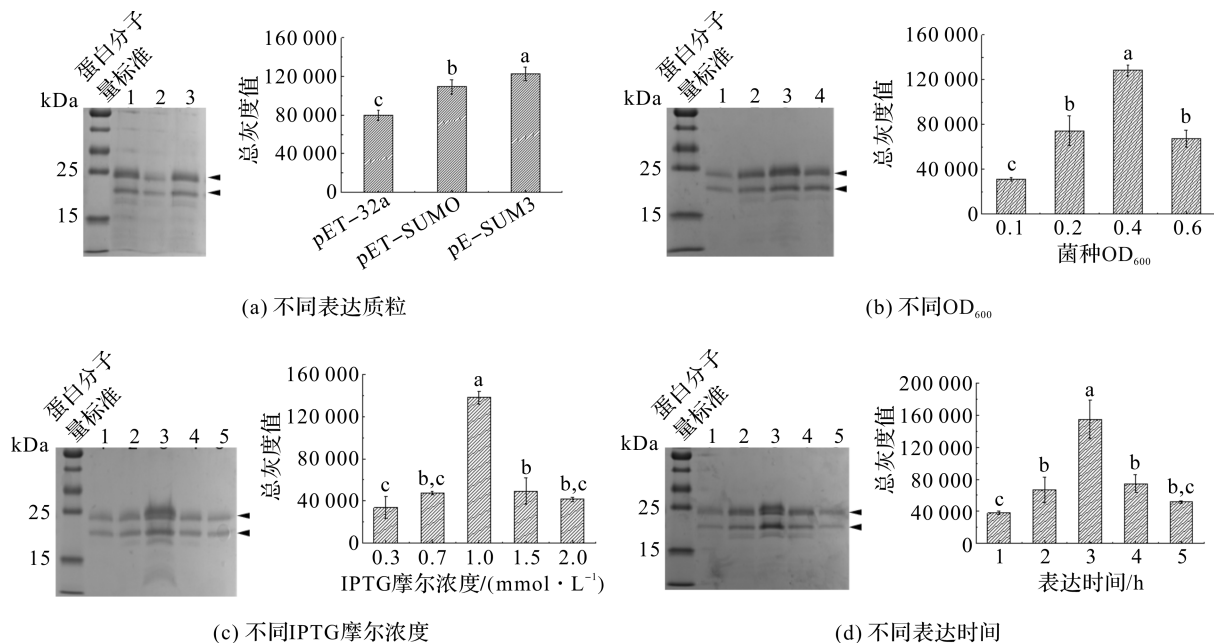


图 5 pE-SUMO3-SPINK6 融合蛋白表达条件的优化

Fig. 5 Optimization of expression conditions of pE-SUMO3-SPINK6 fusion protein

3 结 语

为了提高 SPINK6 重组蛋白的产量而对表达条件进行了优化,得出该系统在菌体 $OD_{600}=0.4$ 时加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达 3 h,可获得最大产量的 SPINK6,为 3.32 mg/L。本文方法为后续大规模发酵生产 SPINK6 提供了坚实的基础,并为 SPINK6 在医学上的研究和应用提供了参考。

参考文献:

- [1] MEYER-HOFFERT U. Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases[J]. Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis, 2009, 57(5): 345.
- [2] VEER S J D, FURIO L, SWEDBERG J E, et al. Selective substrates and inhibitors for Kallikrein-related peptidase 7(Klk7) shed light on Klk proteolytic activity in the stratum corneum[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2017, 137(2): 432.
- [3] PAMPALAKIS G, SOTIROPOULOU G. Insights into the regulation of proteolytic pathways in skin differentiation [J]. British Journal of Dermatology, 2017, 176(6): 1525.
- [4] MCGOVERN J A, MRINERT C, VEER S J D, et al. Attenuated kallikrein-related peptidase activity disrupts desquamation and leads to stratum corneum thickening in human skin equivalent models [J]. British Journal of Dermatology, 2016, 176(1): 150.
- [5] FISCHER J, KOBYAKOVA Y, LATENDORF T, et al. Cross-linking of SPINK6 by transglutaminases protects from epidermal proteases[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2013, 133(5): 1174.

- [6] MEYER-HOFFERT U, WU Z H, KANTYKA T, et al. Isolation of SPINK6 in human skin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(42): 32174.
- [7] CHAVANAS S, BODEMER C, ROCHAT A, et al. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause netherton syndrome[J]. Nature Genetics, 2000, 25(2): 141.
- [8] REDELFS L, FISCHER J, WEBER C, et al. The serine protease inhibitor of Kazal-type 9 (SPINK9) is expressed in Lichen simplex chronicus, actinic keratosis and squamous cell carcinoma[J]. Archives of Dermatological Research, 2016, 308(2): 135.
- [9] WU Z H, WU Y Y, FISCHER J, et al. Skin-derived SPINK9 kills *Escherichia Coli* [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2019, 139(5): 1135.
- [10] TOILLON R A, LAGADEC C, PAGE A, et al. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2007, 6(7): 1240.
- [11] LU H R, HUANG J J, LI G D, et al. Expression, purification and characterization of recombinant human serine proteinase inhibitor Kazal-type 6 (SPINK6) in *Pichia Pastoris* [J]. Protein Expression & Purification, 2012, 82(1): 145.
- [12] 高云, 黄宇烽. 真核表达系统的研究进展[J]. 中华男科学, 2002, 8(4): 292.
- [13] WU Z H, HANSMANN B, MEYER-HOFFERT U, et al. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family[J]. PLOS ONE, 2009, 4(4): e5227.
- [14] 马琳, 申春平. 特应性皮炎与皮肤屏障相关性研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2011, 33(2): 80.
- [15] PRASSAS I, EISSA A, PODA G, et al. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2015, 14(10): 732.
- [16] FISCHER J, WU Z H, KANTYKA T, et al. Characterization of SPINK6 in mouse skin; the conserved inhibitor of Kallikrein-related peptidases is reduced by barrier injury[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2014, 134(5): 1306.