

论著

染料木黄酮对 β 淀粉样肽 25-35 介导的 PC12 细胞凋亡过程 相关基因表达的影响

何玲玲,封锦芳,肖荣,余焕玲,麻微微,丁冰杰,苑林宏
(首都医科大学公共卫生与家庭医学学院,北京 100069)

摘要:目的 研究不同剂量的染料木黄酮(Gen)对 β 淀粉样肽 25-35(A β 25-35)介导的 PC12 细胞凋亡的保护作用,并探讨了可能的分子调控机制。**方法** PC12 细胞传代培养 48 h 后,选取生长良好的同批次细胞,随机分为 5 组,即对照组、A β 模型组(20 μ mol/L)、Gen 干预组(25、50 和 100 μ mol/L)。Gen 预处理 2 h 后,经 A β 25-35 染毒,建立细胞损伤模型;24 h 后,收集细胞,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 PC12 细胞 caspase-3、caspase-9、bcl-xl、bad 和 LRP5 基因的表达。**结果** 与对照组相比,A β 组细胞 caspase-3、caspase-9 和 bad mRNA 表达上调,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),bcl-xl、LRP5 mRNA 表达下调,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 A β 组相比,Gen 高剂量组可显著下调 PC12 细胞 caspase-3、caspase-9 和 bad mRNA 表达($P < 0.05$);Gen 高剂量组可显著上调 bcl-xl、LRP5 mRNA,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** Gen 可能是通过下调细胞凋亡促进基因 caspase-3、caspase-9 和 bad mRNA 表达,上调细胞凋亡抑制基因 bcl-xl、LRP5 mRNA 表达,拮抗 A β 诱导的神经细胞凋亡,从而发挥神经细胞保护作用。

关键词: β 淀粉样肽;染料木黄酮;PC12 细胞;基因表达;细胞凋亡;神经保护作用

中图分类号:R15 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0100-06

Effects of genistein on the expression of apoptosis-related genes in PC12 cells treated by β -amyloid peptides 25-35

He Lingling, Feng Jinfang, Xiao Rong, Yu Huanling, Ma Weiwei, Ding Bingjie, Yuan Linhong
(School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To study the protective effects of genistein (Gen) on the apoptosis of PC12 cells induced by beta amyloid 25-35 (A β 25-35) and its possible mechanism. **Methods** PC12 cells were divided into control group, A β 25-35 group, and 3 Gen groups (at the dosage of 25, 50 and 100 μ mol/L). After pre-incubated with or without Gen for 2 h, PC12 cells were exposed to 20 μ mol of A β 25-35 for 24 h. The relative expression of β -actin, caspase-3, caspase-9, bad, bcl-xl and LRP5 mRNA in PC12 cells were analyzed by RT-PCR. **Results** Compared with the A β treated group, the expression of caspase-3, caspase-9 and bad mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$), but the expression of bcl-xl, LRP5 mRNA were significantly increased ($P < 0.05$) in the high dose Gen group. **Conclusion** The neuroprotection of Gen on PC12 cells against apoptosis induced by A β 25-35 might be the effect of down-regulating the expression of caspase-9, caspase-3 and bad mRNA, and up-regulating the expression of bcl-xl, LRP5 mRNA.

Key words: β -Amyloid peptides; genistein; PC12 cell; gene expression; apoptosis; neuroprotection

β 淀粉样肽 (β -amyloid peptides, A β) 在大脑的不可逆沉积引起的氧化应激是导致脑组织氧化损伤的重要信号,是神经退行性疾病发生发展的重要

原因之一^[1,2]。研究证实,A β 的毒性作用与其可以引起机体氧化应激、激活神经细胞凋亡因子、启动级联式反应的细胞凋亡过程有关^[3]。A β 沉积造成的神经细胞线粒体氧化损伤是神经退行性疾病发生发展的早期关键事件^[4]。线粒体损伤释放细胞色素 C (Cyt c),激活下游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine aspartase, Caspase) 家族级联式反应,改变 Bcl-2 家族基因的表达导致神经细胞凋亡。目前,A β 在脑内诱导神经细胞凋亡的细胞生物学和分子机制尚未完全明了。因此,探讨 A β 介导的神经细胞凋亡对了解神经退行性疾病发生发展有着重要

收稿日期:2010-07-23

基金项目:国家自然科学基金(30771802);北京市教育委员会科技发展计划重点资助项目(KZ200710025011);国家高技术研究发展计划(863 计划:2010AA023003)

作者简介:何玲玲 女 硕士生 研究方向为大豆异黄酮及其活性物质对 β 淀粉样肽致神经细胞线粒体损伤的保护作用及其机制研究 E-mail: qswc1985@yahoo.com.cn

通信作者:肖荣 女 研究生导师

的现实意义。

植物化学物的相关研究发现,白藜芦醇在脑缺血损伤中能不同程度地降低脑组织的过氧化脂质含量,提高大脑皮层及海马区的抗氧化酶如过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,使丙二醛含量明显下降,减轻自由基反应对脑组织的损害,对缺血的脑组织具有保护作用^[5]。PC12 细胞经绿茶多酚预处理后,发现绿茶多酚可下调百草枯介导的凋亡效应蛋白 Cyt c 在胞浆中的过表达、维持线粒体形态、改善细胞形态^[6]。本研究室^[7]前期研究结果证实,染料木黄酮(genistein, Gen)作为大豆异黄酮(soy isoflavones, SIF)最有效的活性成份对 $A\beta$ 引起大脑皮质神经细胞的损伤能够通过下调细胞凋亡促进基因 p53 和 bax 的表达、上调细胞凋亡抑制基因 bcl-2 的表达,从而表现出神经保护作用。那么,Gen 是否通过对细胞凋亡过程中 Caspase 家族和 Bcl-2 家族中其他成员或其他通路分子表达的调控从而发挥其对神经细胞的神经保护作用的呢?

本研究欲通过 $A\beta$ 25-35 细胞染毒建立神经细胞损伤模型,采用不同剂量 Gen 干预处理,同时观察 Gen 对 $A\beta$ 介导的细胞凋亡相关调控基因 caspase-3、caspase-9、bcl-xl、bad 和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5(low density lipoprotein receptor related protein-5, LRP5) 的表达改变的影响,并初步探讨 Gen 对 $A\beta$ 介导的神经细胞凋亡的保护作用其可能分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

神经细胞采用大鼠嗜铬细胞瘤的 PC12 细胞,由中国协和医科大学细胞库提供。PC12 细胞具有神经细胞的许多特征,故常用于替代神经细胞进行研究。

1.2 仪器与试剂

$A\beta$ 25-35、Gen 购自美国 Sigma 公司,DMEM、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒 A3500 购自美国 Promega 公司,Taq DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司,DEPC 购于美国 Amersco 公司。 β -actin、caspase-3、caspase-9、bcl-xl、bad 和 LRP5 引物由上海生物工程技术有限公司合成。

Biometra 梯度 PCR 仪(德国 Whatman)、凝胶成像分析系统(法国 VILBER 公司)、蛋白/核酸分析仪(美国 Bio-Rad 公司)、电泳仪(北京六一仪器

厂)。

1.3 细胞培养

PC12 细胞用含 10% 胎牛血清、10 U/ml 青霉素的 DMEM,在 37 °C、5% CO_2 条件的培养箱中培养,2~3 d 换液传代。

1.4 细胞分组与处理

PC12 细胞培养 48 h,选取生长良好的同批次神经细胞,随机分为 5 组,即对照组、 $A\beta$ 模型组($A\beta$ 25-35, 20 μ mol/L)、Gen 干预组(Gen 分别是 25、50 和 100 μ mol/L)。Gen 预处理 2 h 后,经 $A\beta$ 25-35 染毒,建立细胞损伤模型,24 h 后,收集细胞,以备检测各项指标。本实验是从膳食成分预防的角度来探讨 Gen 的干预作用,且在我们的前期实验中已对实验所用的 Gen 干预剂量进行了初探,证实所用的 Gen 干预剂量对细胞应不会造成损害^[8],所以在制模前先用 Gen 干预处理。

1.5 caspase-3、caspase-9、bcl-xl、bad 和 LRP5 mRNA 表达的检测

用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测指标;在 NCBI 数据库中检索后设计特异引物, β -actin、caspase-3、caspase-9、bcl-xl、bad 和 LRP5 基因的引物序列、退火温度及片段长度见表 1。

表 1 β -actin、caspase-3、caspase-9、bcl-xl、bad、LRP5 基因的引物序列、退火温度及片段长度

Table 1 Primers for β -actin, caspase-3, caspase-9, bcl-xl, bad and LRP5; and the annealing temperature and fragment length

基因	引物序列(5'-3')	退火温度 (°C)	片段长度 (bp)
β -actin	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	58	348
	TAAAACGCCAGCTCAGTAACAGTCCG		
caspase-3	GGCACACGGGACTTGAAAG	58	135
	TGACTCAGCACCTCCATGATTAAG		
caspase-9	GCTTGGTGGTGCATCCTC	58	716
	CTGAGAAGGAGGGACTGCAG		
bcl-xl	AATGTCTCAGAGCAACCGG	64	732
	CTTCCGACTGAAGAGTGAG		
bad	AGAGTTTGAGCCGAGTGAGCAGG	60	408
	CTGGCGCTTTGTCCGATCTGTG		
LRP5	GGAGTCTCAGCCCATCCTTGTG	60	337
	GAGACAGACAGCATCGCAGCCT		

1.6 总 RNA 的提取

①每组收集 5×10^6 个/ml 细胞于离心管中,离心去上清液,加 1 ml 的 Trizol 试剂,反复吹打混匀;②室温放置 5 min,加入 0.2 ml 氯仿,用力振荡后常温放置 2 min,然后在 2~8 °C 下以不超过 $12\ 000 \times g$ 高速冷冻离心 15 min;③将水样层转移到干净的试管中,加入 0.5 ml 异丙醇,室温放置 10 min,然后在 2~8 °C 下以不超过 $12\ 000 \times g$ 的离心力高速冷冻离心 10 min;④移去上层悬液,用 75% 的乙醇洗涤

RNA 沉淀,轻弹混匀样品后以不超过 $7\ 500 \times g$ 冷冻离心 5 min;⑤弃去上清,室温干燥至半透明状,并以 $20\ \mu\text{l}\ 1\%$ DEPC 水溶解 RNA。

1.7 反转录和扩增

取 $1\ \mu\text{g}$ 总 RNA, $70\ ^\circ\text{C}$ 10 min 后放置冰上。配置 $20\ \mu\text{l}$ 逆转录反应体系,反转录形成 cDNA;以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获取 PCR 扩增产物,经 2% 琼脂糖凝胶电泳 ($65\ \text{V}, 80\ \text{min}$),电泳完毕后,取出凝胶在紫外灯下观察结果并照相。结果用 VILBER BIO-LIGHT 凝胶成像系统软件进行半定量分析,以 β -肌动蛋白作为内参照,用目的基因与相应的 β -肌动蛋白条带平均光密度比值表示目的基因 mRNA 的相对表达量,重复实验 5 次。

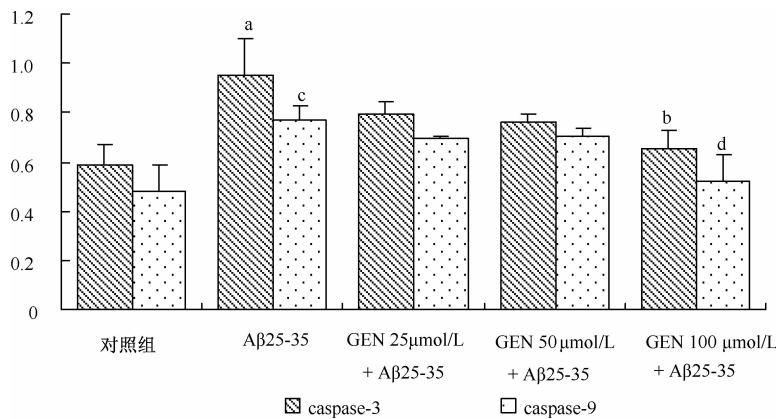
1.8 数据处理

所有数据均以均数 \pm 标准误表示,用 SPSS 13.0 统计软件包进行单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染料木黄酮对 PC12 细胞 caspase-3、caspase-9 基因表达的影响

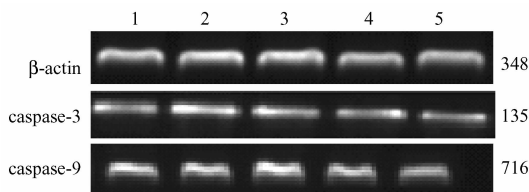
与对照组相比, $A\beta$ 模型组 PC12 细胞 caspase-3、caspase-9 mRNA 表达上调,其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与 $A\beta$ 模型组相比,Gen 高剂量组可显著下调 PC12 细胞 caspase-3、caspase-9 mRNA 表达 ($P < 0.05$),其余两组差异无统计学意义,见图 1 和图 2。



注: ^a 与对照组相比 $P < 0.05$; ^b 与模型组相比 $P < 0.05$; ^c 与对照组相比 $P < 0.05$; ^d 与模型组相比 $P < 0.05$ 。

图 1 染料木黄酮对 PC12 细胞 caspase-3、caspase-9 基因表达的影响

Figure 1 Effect of Gen on the expression of caspase-3 and caspase-9 in PC12 cells



1: 对照组; 2: $A\beta 25-35$ 组; 3: GEN $25\ \mu\text{mol/L}$ + $A\beta 25-35$;
4: GEN $50\ \mu\text{mol/L}$ + $A\beta 25-35$; 5: GEN $100\ \mu\text{mol/L}$ + $A\beta 25-35$

图 2 caspase-3 和 caspase-9 的 RT-PCR 结果

Figure 2 The products of caspase-3 and caspase-9 mRNA in RT-PCR

2.2 染料木黄酮对 PC12 细胞 bcl-x1、bad 基因表达的影响

与对照组相比, $A\beta$ 组 PC12 细胞 bcl-x1 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$), bad mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$);与 $A\beta$ 组相比,Gen 高剂量组可显著上调 PC12 细胞 bcl-x1 mRNA,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),其余两组差异均无统计学意义;Gen 高剂量组可显著下调 PC12 细胞 bad mRNA 的表达,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),其余两组差异均无统计学意义,见图 3 和图 4。

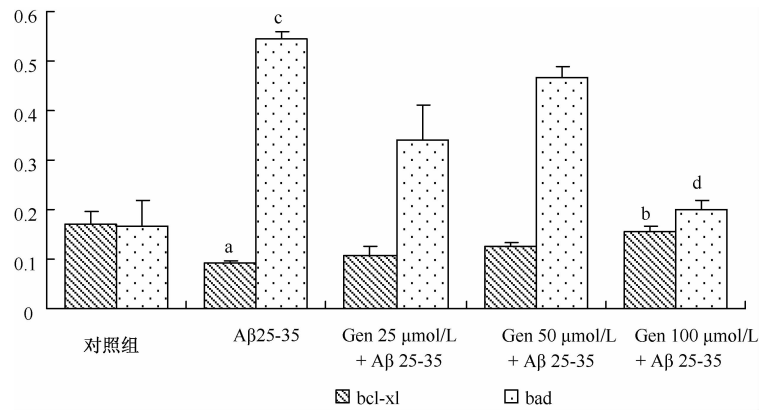
2.3 染料木黄酮对 PC12 细胞 LRP5 基因表达的影响

与对照组相比, $A\beta$ 组 PC12 细胞 LRP5 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$);与 $A\beta$ 组相比,Gen 高剂量组明显上调 PC12 细胞 LRP5 mRNA 表达,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 5 和图 6。

3 讨论

细胞凋亡是细胞在一定的生理条件下,通过启动自身内部机制而发生的自然死亡,是一个受到高度调节的生理性死亡过程。细胞线粒体是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心,参与调控细胞凋亡过程。在细胞凋亡信号作用下,线粒体膜通透性增加,由此引发线粒体产生一系列关键性变化,包括线粒体通透性转换孔开放和膜电位的下降、Cyt c 的释放以及 Bcl 基因家族成员的表达改变等。

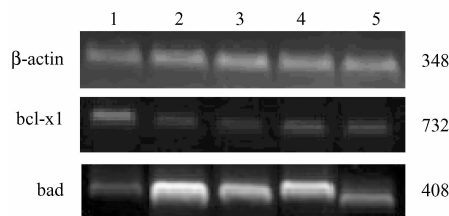
$A\beta$ 是由 39 ~ 43 个氨基酸组成的多肽片段,是脑组织老年斑的主要成分,其在脑内沉积是老年性痴呆发生发展的重要病理基础。转基因小鼠 AD 模



注: ^a与对照组相比 $P < 0.05$; ^b与模型组相比 $P < 0.01$; ^c与对照组相比 $P < 0.01$; ^d与模型组相比 $P < 0.01$ 。

图3 染料木黄酮对 PC12 细胞 bcl-xl、bad 基因表达的影响

Figure 3 Effect of Gen on the expression of bcl-xl and bad in PC12 cells

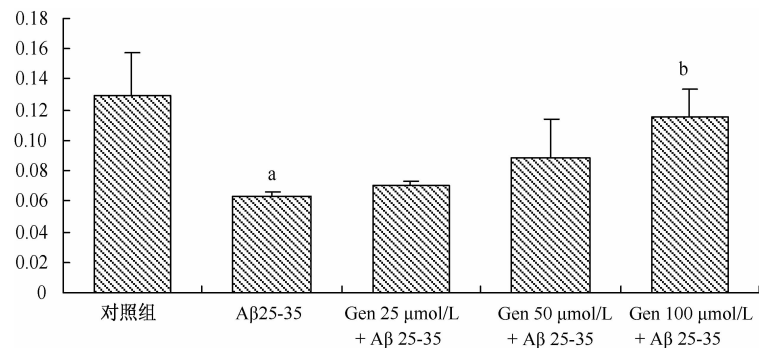


1: 对照组; 2: A β 25-35 组; 3: Gen 25 $\mu\text{mol/L}$ + A β 25-35;
4: Gen 50 $\mu\text{mol/L}$ + A β 25-35; 5: Gen 100 $\mu\text{mol/L}$ + A β 25-35

图4 bcl-xl、bad 的 RT-PCR 结果

Figure 4 The products of bcl-xl and bad mRNA in RT-PCR

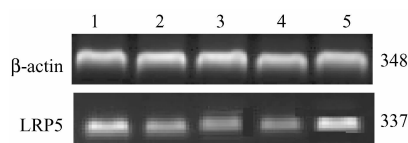
型研究发现,沉积于神经细胞内的 A β 可迅速激活促凋亡蛋白 P53 表达,使神经细胞出现 P53 依赖性细胞凋亡。A β 1-40 作用于体外培养的原代海马神经细胞,可下调抑制凋亡基因 bcl-2 的表达,上调促凋亡基因 bax 的表达^[9]。然而,A β 是如何在脑内诱导神经细胞凋亡的,其作用的分子机制仍然不清楚;因此,探讨 A β 介导的神经细胞凋亡在神经退行性疾病发生发展过程中扮演的角色具有较大的意义。



注: ^a与对照组相比 $P < 0.05$; ^b与模型组相比 $P < 0.05$ 。

图5 染料木黄酮对 PC12 细胞 LRP5 基因表达的影响

Figure 5 Effect of Gen on the expression of LRP5 in PC12 cells



1: 对照组; 2: A β 25-35 组; 3: Gen 25 $\mu\text{mol/L}$ + A β 25-35;
4: Gen 50 $\mu\text{mol/L}$ + A β 25-35; 5: Gen 100 $\mu\text{mol/L}$ + A β 25-35

图6 LRP5 的 RT-PCR 结果

Figure 6 The products of LRP5 mRNA in RT-PCR

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用。根据其在细胞凋亡信号级联反应中的位置,可将其分为两类:上游调控 caspase 活化

的启动子 caspase (包括 caspase-1、8、9)和下游介导凋亡的效应子 caspase (包括 caspase-3、6、7),其中 caspase-3、caspase-9 在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的促进作用^[10]。大部分 Bcl-2 家族蛋白通过羧基末端的疏水基插入到线粒体外膜上,在调控神经细胞凋亡和生存中发挥重要作用,根据其在细胞凋亡中的作用不同,Bcl-2 家族蛋白分为两大类:抑制凋亡蛋白(如 bcl-2、bcl-xl 和 bcl-w 等)和促进凋亡蛋白(如 bax、bad 和 bak 等)^[11]。bcl-xl 是 bcl-2 家族的一个重要成员,位于线粒体、内质网和核膜内,含一个疏水性羧基末端的跨膜结构,其作用及

亚细胞分布类似于 bcl-2,也是抑制细胞凋亡的基因,其作用可能与 bcl-xl 结合和灭活凋亡蛋白酶活化因子-1,阻断对 caspase-9 活化有关;bad 是 bcl-2、bcl-xl 相关促进凋亡的因子,磷酸化的 bad 不能和 bcl-2 或 bcl-xl 结合,但能与分子伴侣蛋白 14-3-3 结合成无活性的复合体。当接受凋亡信号刺激后,去磷酸化的 bad 与分子伴侣 14-3-3 解离,发挥其促凋亡作用^[12,13]。LRP5 是一种单次跨膜的细胞膜表面蛋白,是经典的 Wnt 信号传导通路的组成部分,作为 Wnt 蛋白的共受体参与 Wnt 信号传导通路^[14];其中 Wnt 信号传导通路中的 Wnt/ β -连环蛋白通路与细胞凋亡的关系目前是很多学者关注的焦点,那么,LRP5 能否参与 Wnt/ β -连环蛋白通路作用而达到其阻抑 A β 致神经细胞凋亡的作用呢?

本研究结果显示,A β 25-35 可上调 caspase-3、caspase-9 和 bad 的表达,下调 bcl-xl、LRP5 的表达,提示 A β 25-35 引起的凋亡机制可能是凋亡信号激活 Caspase 级联式反应,一旦上游调控基因等被启动,引起 Caspase 的断裂及激活下游的效应子 caspase-3 等,再作用于细胞骨架蛋白、DNA 修复调节因子、细胞周期调节成分及 bcl-2 家族的某些成员(如 bcl-2、bad 等),使之失活或破坏,从而导致细胞 DNA 修复功能丧失,细胞失去正常增殖分化能力形成凋亡。bcl-xl 分子的表达则可以抑制线粒体活性氧的生成和阻止细胞凋亡的发生。LRP5 表达下降,提示 A β 25-35 可能通过抑制 LRP5 的表达从而影响其 Wnt/ β -连环蛋白通路的正常过程而引起神经细胞凋亡。研究显示,bcl-2 是 β -连环蛋白的靶基因,能够参与 Wnt/ β -连环蛋白通路作用^[15],那么 LRP5 与 Bcl 家族基因的表达是否有关系呢?需要进一步的研究和探讨。

多种植物化学物及其代谢产物对细胞凋亡过程具有调控作用。茶多酚对 6-OH 多巴胺诱导的帕金森 PC12 细胞模型作用,能明显改变凋亡细胞核变化,防止线粒体膜电位下降,降低细胞内活性氧和钙离子积累,从而减少 6-OH 多巴胺诱导的早期凋亡率^[16]。姜黄素对 A β 25-35 预处理的 PC12 细胞作用,可增加 p21 基因的 mRNA 和蛋白表达,引起细胞周期抑制于 G₀ 期来调控细胞周期的重新分布,从而抑制随后发生的细胞凋亡^[17]。Gen 具有多羟基的结构特点,表现出较强的抗氧化作用,此外它还具有拟雌激素样作用,其对神经退行性疾病的神经保护作用已引起广泛关注。本研究着重于 Gen 的抗氧化损伤作用,结果显示 Gen 可上调细胞凋亡抑制基因 bcl-xl、LRP5 表达,下调 caspase-3、caspase-9 和 bad 的表达。因而 Gen 可能是通过调控凋亡信

号传导通路中的 Caspases、Bcl-2 家族激活途径上相关基因的表达(如 caspase-3、caspase-9、bcl-xl 和 bad 等),以及参与调控 LRP5 在 Wnt/ β -连环蛋白通路中的正常表达,发挥拮抗 A β 的神经毒性作用。

综上所述,Gen 阻抑 A β 的毒性作用可能与其调控 Caspases 家族、Bcl-2 家族和 Wnt/ β -连环蛋白通路中的 LRP5 等相关基因的表达,拮抗 A β 所引起的细胞凋亡有关。本研究从膳食预防的角度,探讨 Gen 神经保护作用的分子机制,为预防和治疗神经退行性疾病提供了一个新思路。

参考文献

- [1] McLELLEN M,KAJDASZ S,HYMAN B,et al. In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with the isoflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy [J]. J Neurosci, 2003, 23(6): 2212-2217.
- [2] CREWS L, MASLIAH E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's Disease[J]. Human Molecular Genetics, 2010. doi:10.1093/hmg/ddq160.
- [3] TANG Xiaoqing, FENG Jianqiang, CHEN Jin, et al. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2[J]. Brain Res, 2005, 1057(1-2):57-64.
- [4] REDDY P, BEAL M. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease [J]. Trends in Molecular Medicine, 2008, 14(2):45-53.
- [5] 王瑾,杜江,邱德文.天然活性成分白藜芦醇抗氧化作用的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005,26(2): 155-156.
- [6] 厚荣荣,陈建宗,陈宏,等.绿茶多酚主要成分对百草枯诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 神经解剖学杂志,2007,23(1): 83-87.
- [7] YU Huanling,LI Li, ZHANG Xiaohong,et al. Neuroprotective effects of genistein and folic acid on apoptosis of rat cultured cortical neurons induced by b-amyloid 31-35 [J]. Br J Nutr, 2009,102: 655-662.
- [8] MA Weiwei, YUAN Linhong, YU Huanling, et al. Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by β -amyloid peptides 25-35 in PC12 cells [J]. Int J Develop Neurosci, 2010,28: 289-295.
- [9] RAYNAUD F, MARCILHAC A. Implication of calpain in neuronal apoptosis-A possible regulation of Alzheimer's disease [J]. Febs J, 2006,273 (15):3437-3443.
- [10] NUTKU E, HUDSON S A, BOCHNER B S. Mechanism of Siglec-8-induced human eosinophil apoptosis: Role of caspases and mitochondrial injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336: 918-924.
- [11] NURIA LO'PEZ-ROYUELA A, PATRICIA PE'REZ-GALA' N B, PATRICIA GALA'N-MALO, et al. Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79: 1746-1758.
- [12] DISTELHORST C W, SHORE G C. Bcl-2 and calcium:

- controversy beneath the surface[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2875-2580.
- [13] 刘志,郑军. Bcl-2 家族蛋白及其在细胞凋亡中的作用[J]. *生命的化学*, 2007, 27(1): 22-25.
- [14] KAGAN V E, BAYIR H A, BELIKOVA N A, et al. Cytochrome *c*/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death[J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2009, 46(11): 1439-1453.
- [15] 乔玲,徐治立,谭旭,等. 间充质干细胞释放 Dkk-1 抑制乳腺癌细胞 Wnt/ β -catenin 途径的实验研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(7): 702-708.
- [16] 赵保路. 茶多酚保护神经防止帕金森病损伤作用及其分子机理[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(7): 735-743.
- [17] 谢朝阳,祝其锋,吴斌华. 姜黄素对 β -淀粉样肽(25-35)诱导去血清培养 PCI2 细胞周期异常与细胞凋亡的影响[J]. *中国新医药杂志*, 2007, 16(1): 36-40.

论著

重组人乳铁蛋白对大鼠生长发育作用的研究

王小丹,刘珊,严卫星,徐海滨

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 研究从转基因牛乳中分离纯化的重组人乳铁蛋白是否具有促进动物生长发育的作用。方法 给大鼠灌胃重组人乳铁蛋白共 8 周,设低、中、高 3 个剂量组(0.375、0.75 和 2.25 g/kg BW·d),以水为对照组。检测指标包括动物体重、身长、摄食量和食物利用率。结果 高剂量组体重、身长和食物利用率指标均显著优于对照组,低、中剂量组的体格发育指标较对照组有轻度改善。结论 在本研究条件下,重组人乳铁蛋白具有促进大鼠生长发育的作用。

关键词:转基因;重组;乳铁蛋白;促进生长发育

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0105-04

Effect of recombinant human lactoferrin on improving the growth of rats

Wang Xiaodan, Liu Shan, Yan Weixing, Xu Haibin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To study whether the growth of rats will be improved by recombinant human lactoferrin (rhLF) separated and purified from transgenic cow milk. **Methods** rhLF was administered by gavage to 4 groups of 14 male weaned Wistar rats at doses of 0.375, 0.75 or 2.25 g/(kg BW·d) for 56 days. Body weight, body length and food consumption were recorded at regular intervals. **Results** Compared with the control group, the physical parameters including body weight, body length and food utilization were improved obviously in the high dose group. There is a slight improvement on physical parameters in the low and medium dose groups. **Conclusion** Recombinant human lactoferrin might show a function of improving the growth of rats in this study.

Key words: Transgene; recombinant; human lactoferrin; growth improvement

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是由哺乳动物腺上皮细胞表达和分泌的一种 80 kDa 左右的铁结合性糖蛋白,属于转铁蛋白家族成员。越来越多的研究表明,乳铁蛋白具有多种生物学作用,包括调节体内

铁稳态、广谱抗微生物作用、抗炎作用、调节细胞生长和分化以及抑制癌症发生和转移等^[1]。最近的研究还发现,乳铁蛋白具有很强的成骨作用,从而促进骨骼生长^[2,3]。由于天然乳铁蛋白主要从乳清中分离得到,昂贵的价格限制了其大规模应用。转基因技术为生产成本较低的重组乳铁蛋白提供了新的技术手段。重组蛋白研究的一个重要方面就是对重组蛋白进行生理功能的分析鉴定,只有确定了重组蛋白和天然同种蛋白具有相同的生物活性,才能实现前者对后者的成功替代。本实验以大鼠

收稿日期:2010-08-04

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划项目)
(2007AA100506)

作者简介:王小丹 女 硕士生 研究方向为食品卫生学 E-mail:
suzhou1985@sina.com

通信作者:徐海滨 男 研究员