

· 论 著 ·

人 β -NGF 重组质粒转染 GFP 转基因小鼠 BMSC 的实验研究*

刘强和,王亮亮,王翔,王永宝,黄鑫,邓铭,刘芳贤

(桂林医学院附属医院/桂林医学院耳鼻喉研究所耳鼻喉-头颈外科,广西桂林 541001)

摘要:目的 观察携带有人 β 神经生长因子(β -NGF)重组质粒的骨髓基质干细胞(BMSC)的生物学特性。方法 培养小鼠 BMSC,采用脂质体 Lipofectamine™2000(Lip2000)转染方法将含有人 β -NGF 基因的重组质粒转染至含有绿色荧光蛋白(GFP)基因的小鼠 BMSC 中,利用酶联免疫吸附测定(ELISA)的方法检测其 β -NGF 蛋白的表达水平。结果 采用脂质体 Lip2000 转染方法能成功地将 β -NGF 重组质粒转染至 BMSC,转染后细胞出现 β -NGF 基因的表达,并且其表达的 β -NGF 蛋白能有效地保护转染过程中对细胞的损害。结论 经转染后携带 β -NGF 基因质粒的小鼠 BMSC 仍有增殖、分化能力,并且具有了 β -NGF 蛋白的表达能力。

关键词:神经生长因子;绿色荧光蛋白类;Lipofectamine 2000;转染;小鼠;骨髓基质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1161-03

Experimental study on transfection of human β -NGF recombinant plasmid into BMSCs of GFP transgenic mouse*

Liu Qianghe, Wang Liangliang, Wang Xiang, Wang Yongbao, Huang Xin, Deng Ming, Liu Fangxian

(Affiliated Hospital of Guilin Medical University/Otolaryngology

Institute of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract:Objective To investigate the biological features of the mouse bone marrow stromal stem cells(BMSCs) transfected by human β nerve growth factor(β -NGF). **Methods** BMSCs of GFP transgenic mouse were isolated and cultured. The β -NGF recombinant plasmid vectors were transferred into the cultured BMSCs by Lipofectamine™2000. The expression of β -NGF was detected with ELISA. **Results** The β -NGF recombinant plasmid vectors were successfully transferred into BMSCs of GFP transgenic mouse, the expression of β -NGF in transfected cells appeared. In addition, the expression of β -NGF could effectively protect the BMSCs which were injured in transfection process. **Conclusion** BMSCs of GFP transgenic mouse after transfection with human β -NGF have the proliferation and differentiation capacity, and possess the expression ability of β -NGF protein.

Key words:nerve growth factor;green fluorescent proteins;lipofectamine 2000;transfection;mice;bone marrow stromal stem cells

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSC)作为细胞水平治疗疾病的主要来源之一,其具有自身的优势,如分化潜能好、来源丰富、不存在胚胎干细胞移植所带来的伦理学问题,又可用于自体移植,免除了宿主可能的免疫排斥反应,具有良好的应用前景^[1]。它可分化为各种类型的间充质细胞,在适当的条件下, BMSC 也可跨胚层分化为非间充质细胞,近来 Jiang 等^[2]研究表明, BMSC 还能产生神经细胞。此外, BMSC 在体外能被神经营养因子(NTFS)诱导分化为多种成体细胞,分泌一系列细胞因子,促进神经元生长发育,因此被视为多种组织细胞移植的替代来源及基因治疗的有效运载工具,已成为细胞移植与基因治疗领域中的研究热点。神经生长因子(NGF)属于神经营养因子家族(BDNF),是由 Levi-Montalcini 于 20 世纪 50 年代在小鼠骨肉瘤细胞中发现的第 1 个 NTFS,后来又相继发现了睫状 NTFS、胶质细胞源性 NTFS 等,他们与 NGF 共属于 BDNF。其中,对于 NGF 的研究一直占有很大的比重,也是目前研究最为透彻的,本实验通过 Lipofectamine™2000(Lip2000)转染人 β -NGF 重组质粒至小鼠 BMSC,观察细胞的生长情况,同时利用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清液中人 β -NGF 水平,从而进一步了解体外条件下 NGF 对小鼠 BMSC 生长情况的影响,为神经退行性疾病及神经损伤的细胞治疗和基因治疗提供科学的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 重组质粒 pcDNA3- β -NGF 为本实验室构建;脂质体 Lip2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;含绿色荧光蛋白(GFP)的荧光 BMSC、DMEM-F12 BMSC 培养基、胎牛血清、L-谷氨酰胺及青霉素、链霉素购自赛业公司;质粒提取试剂盒、凝

胶回收试剂盒购自北京康为世纪科技有限公司;LB 培养基、JM109 大肠埃希菌、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)购自桂和试剂公司;T4-DNA 连接试剂盒及限制性内切酶 Hind III、Xho I 购自 fermentas 公司;DNA Marker 购自北京艾德莱生物科技有限公司;0.25%胰蛋白酶乙二胺四乙酸(EDTA)购自 HyClone 公司;CD34、CD44、CD117 及同型对照流式抗体购自 Biolegend 公司;ELISA 试剂盒购自达科为公司。

1.2 方法

1.2.1 BMSC 的培养 (1)细胞复苏:将-200℃液氮保存的细胞取出,立即放入 37℃恒温水浴锅内迅速解冻,并不断地摇动,使管中液体迅速融化,约 1~2 min 后待冻存管内液体完全解冻后取出并用乙醇棉球擦拭冻存管外壁,将细胞从冻存管中吸出到已加入 5 mL 培养基的 12 mL 离心管内,混匀后放入离心机 1 500 r/min 离心 5 min,观察到细胞沉淀,吸弃上清液并加入 4 mL 新鲜培养基,用吸管反复、轻柔抽吸培养基,使细胞从离心管底壁上脱落,并制成单细胞悬液。收集细胞悬液接种于一次性 25 cm² 培养瓶中,置于 37℃5%CO₂ 孵育箱中培养,隔 2 d 换液 1 次,倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况。(2)小鼠 BMSC 的传代:待培养瓶内细胞融合至 80%~90%时开始传代,吸去培养液,以预热的 PBS 缓冲液轻轻冲洗后,吸去 PBS。加入 0.70~1.00 mL 的 0.25%胰蛋白酶-EDTA,于培养箱中孵育 2~3 min,至于显微镜下观察细胞形态变化,带镜下细胞之间突起消失、变圆后,加入含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 新鲜培养基终止消化,用吸管轻轻吹打数次,移至 15 mL 的离心管内,1 200 r/min 离心 5 min,观察管底细胞沉

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060083);广西科技厅技术与开发项目(桂科攻 10124001B-56)。 作者简介:刘强和(1970—),教授,博士研究生,主要从事老年性耳聋的诊治研究。

淀,弃去上清液,以含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养液重悬,用吸管轻柔吹打成细胞悬液,按 1:2 的比例分装入新的培养瓶中,置于 37℃ 5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中继续培养。以后待细胞铺满瓶底 80%~90%时重复以上步骤传代。

1.2.2 对 BMSC 进行流式表型鉴定 待细胞传至第 4 代 90%左右,吸去培养基用 PBS 充分洗涤细胞 2 次,加入 0.25%胰蛋白酶室温消化 1 min,加入新鲜含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,放入 15 mL 离心管中 1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 PBS 洗涤后轻柔吹打成单细胞悬液并计数,调整细胞浓度为 5×10⁵ 个/mL,按流式抗体说明书操作步骤各管加入适量 FITC-CD44、FITC-CD45、FITC-CD54,每管设立同型对照,4℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤后重悬,过滤后上机检测并分析。

1.2.3 重组质粒的提取与鉴定 将含有连接好的 pcDNA3-β-NGF 质粒的感受态大肠埃希菌,按质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,质粒提取反应如下:取转化后含有重组质粒的阳性克隆菌夜 10 mL 加入离心管中,12 000 r/min 离心 1 min 收集细菌,弃其上清液,向留有细菌的离心管中加入 500 μL Bufferp1 重悬细菌,再加入 500 μL Bufferp2 以裂解菌体,室温放置 5 min,见溶液变得清亮黏稠后,加入 500 μL BufferE3,上下颠倒 8 次,室温放置 5 min,见形成白色絮状沉淀,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液加入 Endo-RemoverColumn 中,将其放入收集管中,12 000 r/min 离心过滤 1 min,将其滤液转入新的 EP 管中,向滤液中加入 450 μL 异丙醇混匀,将混合液移至吸附柱中,12 000 r/min 离心 1 min,向吸附柱中加入 600 μL BufferPW,12 000 r/min 离心 1 min,重复上述步骤 1 次,12 000 r/min 离心 2 min,取出吸附柱并室温下干燥 5 min,将吸附柱移至一新的 EP 管中,向吸附柱中间膜加入 100 μL Endo-freeBufferpEB,室温放置 5 min,12 000 r/min 离心 2 min 收集重组质粒。将其进行 Hind III、Xho I 双酶切及测序鉴定后,-20℃保存备用。

1.2.4 脂质体 Lip2000 转染重组质粒 pcDNA3-β-NGF 将培养好的 BMSC 消化离心后,轻柔吹打成密度为 1×10⁶ 个/mL 的细胞悬液,并将欲转染的细胞分为 4 组,重组质粒组:脂质体 Lip2000 包裹的重组质粒转染;Lip2000 组:脂质体 Lip2000 转染;空质粒组:为脂质体 Lip2000 包裹的空质粒转染;阴性对照组:含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液。按 1×10⁵ 个/mL 的密度接种于 35 mm 培养皿内加入 3 mL 含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基,培养 24 h 后,细胞达到 60%~80%融合,在转染前 1 d,换无血清培养基培养 1 d,按脂质体 Lip2000 转染试剂操作说明书进行转染。将 4 μg 质粒溶于 250 μL 无血清无双抗培养基中,得到 A 液,将 10 μL 脂质体 Lip2000 溶于 250 μL 无血清无双抗培养基中,得到 B 液,孵育 5 min,将 A 液与 B 液混匀,轻轻混匀在室温下孵育 25 min。重组质粒组与空质粒组培养皿中加入混合液 500 μL 以及 2 mL 无血清无双抗培养基,脂质体转染组加入脂质体 Lip2000 500 μL 以及 2 mL 培养基,Lip2000 组加 2.5 mL 培养基,将 4 组细胞放入 37

℃ 5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 8 h 后更换含 10%胎牛血清及双抗的培养基,转染后 48 h 后,观察细胞形态及 β-NGF 蛋白表达水平。

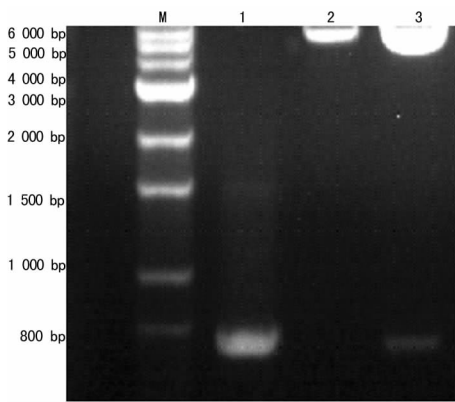
1.2.5 ELISA 检测转染重组 BMSC 中 β-NGF 蛋白表达 于倒置光学显微镜下观察转染 48 h 后各组细胞生长情况,收集转染后 48 h 各组细胞上清液,按达科为 β-NGF ELISA 检测试剂盒说明书操作步骤,检测各组细胞上清液中 β-NGF 蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件,在 Windows XP 系统下操作。对小鼠 BMSC 进行 3 种表面抗原 CD34、CD44、CD117 流式细胞仪表型鉴定,其阳性表达率用 % 表示;对 β-NGF 蛋白表达水平用 ELISA 检测,各组间均数比较采用单因素的方差分析和独立样本的 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒双酶切水平 重组质粒 pcDNA3-β-NGF 经限制性内切酶 Hind III 和 Xho I 双酶切后,酶切片段与插入基因片段大小相符约 725 bp,见图 1。

2.2 BMSC 表型鉴定 对培养细胞进行细胞表面抗原标志的流式细胞鉴定,每种抗体各测定 6 次,进行标准差分析,结果显示,细胞 CD34、CD44、CD117 表面抗原表达阳性率分别为 (95.08±3.11)%、(96.28±2.27)%、(2.24±0.72)%,见图 2。



M:DNA 标记物;1:连接前 NGF;2:重组质粒;3:双酶切重组质粒。

图 1 重组质粒双酶切鉴定

2.3 ELISA 检测重组质粒 β-NGF 蛋白表达水平 β-NGF 蛋白 ELISA 检测结果表明,重组质粒组为 (174.91±4.71)pg/mL,空质粒组、Lip2000 组、阴性对照组分别为 (5.94±0.91)、(5.71±0.50)、(5.79±0.80)pg/mL,重组质粒组 β-NGF 蛋白表达水平明显高于其他组 β-NGF 蛋白表达水平,差异有统计学意义 (*P*<0.05)。

2.4 转染后各组小鼠 BMSC 形态观察 荧光显微镜下可以看到培养瓶中细胞集落多,细胞规则,呈长梭形、椭圆形,折光性强,细胞间相互融合基本铺满瓶底。与空质粒组、Lip2000 组比较,重组质粒组的细胞形态良好;而与阴性对照组比较,细胞形态无较大差别,见图 3。

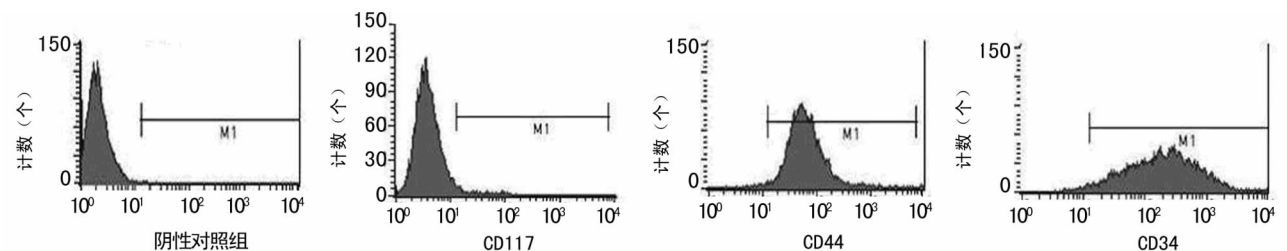
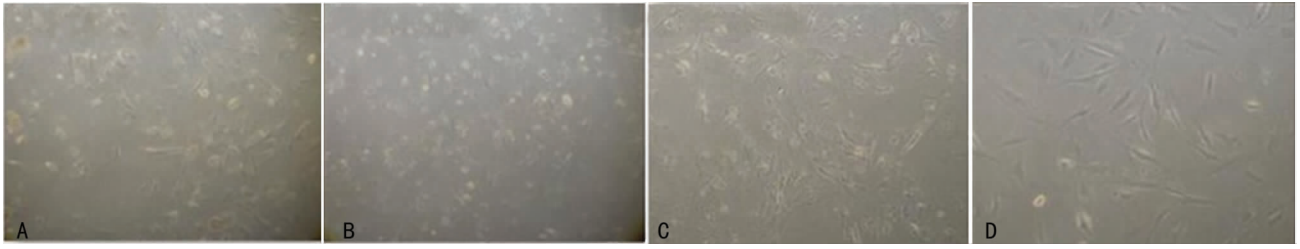


图 2 细胞表面抗原 CD34、CD44、CD117 流式细胞仪表型鉴定



A:重组质粒组;B:空质粒组;C:Lip2000 组;D:阴性对照组。

图 3 转染后显微镜下各组细胞形态观察($\times 200$)

3 讨 论

本实验采用的靶细胞为 BMSC,它具有植入反应弱、外源目的基因在 BMSC 中转染效率高并能稳定高效表达,利用基因修饰后的 BMSC 进行动物移植已开始做一些临床实验^[3-4],葛圣雷等^[5]选用良好的 BMSC 进行耳蜗移植实验,实验成功证明了其内耳移植的可行性,本研究将重组质粒转染至小鼠 BMSC,为下一步动物移植提供了实验支持。

将目的基因 β -NGF 导入 BMSC,这就需要基因导入载体,目前比较常见的基因导入载体有病毒载体和非病毒载体,但是每一种载体都有其自身的局限性,病毒载体有病毒复制可能和严重的细胞毒性甚至引发机体 T 细胞介导的免疫反应等,本实验选用的非病毒载体脂质体 Lip2000 则是现在极为常用的阳离子脂质体转染试剂,它在提高了转染效率的同时,也降低了细胞毒性,减小其自身缺点^[6],但对细胞仍有一定影响,空质粒组、Lip2000 组与阴性对照组细胞图片比较,可以明显地看到脂质体 Lip2000 对细胞的损伤。

近年来研究表明 BDNF 具有营养及诱导 BMSC 分化的作用,体外研究表明,BDNF 可诱导 BMSC 向神经元样细胞分化^[7],其机制目前认为是与受体信号传导系统有密切关系, β -NGF 作为发现及研究较早的 NTFS 之一,和 BDNF 受体结合后可以激活一系列细胞生物反应,促使 BMSC 从未分化状态的细胞向成熟神经元分化和发育^[8]。周琼等^[9]研究表明, β -NGF 可诱导 BMSC 定向分化为神经元样细胞且存活时间长,100 ng/mL 的 β -NGF 可以起到较好的促进 BMSC 向神经元样细胞分化的作用,总之, β -NGF 对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用,并且还还对损伤及老化的神经细胞有一定的保护和修复作用^[10]。在外周神经系统的病变及一些神经元退行性疾病,例如早老年性痴呆症、老年性耳聋的治疗方面具有良好的应用前景^[11],近年研究表明,耳蜗毛细胞和螺旋神经元的减少和退化是老年性耳聋的关键因素^[12-14],基于 β -NGF 具有的营养神经元、促进突起生长及诱导干细胞分化为神经元的生物学特性,为了更好地将其应用于老年聋的临床研究,能够高效、稳定表达 β -NGF 基因的细胞模型就显得必不可少,本实验建立了含 β -NGF 基因的细胞系,为该基因对于听力学进一步的功能研究建立了切实可靠的实验基础。

有研究学者将 β -NGF 蛋白转入 GFP 转基因小鼠的 BMSC 中,并利用免疫组织化学检测到 β -NGF 蛋白的表达,在本实验中,将已经构建好的 β -NGF 重组质粒载体转染进小鼠 BMSC,首先对细胞进行流式细胞学表型鉴定,然后收集细胞上清液,利用 ELISA 检测法确定目的蛋白是否在 BMSC 中持续表达。其中各组细胞图片对比可直观下观察各组细胞形态;而 ELISA 是从蛋白质水平上显示有人 β -NGF 蛋白表达,重组质粒组表达量为 (174.91 ± 4.71) pg/mL,通过 ELISA 检测结果以及重组质粒组与其他组细胞图片比较发现,重组质粒组细胞形态规则,呈长梭行,细胞质、细胞核清晰,生长情况明显优于其他组。因此,本研究认为已将构建的重组载体导入小鼠

BMSC,并可以表达 β -NGF,且表达的 β -NGF 蛋白具有减少转染过程中对细胞的损害,营养及保护靶细胞的作用。

另外,GFP 是细胞研究的常用蛋白标记^[15],是一种能在现代细胞生物学和分子生物学研究与临床检测中发挥重要作用的较理想的报告基因,具有荧光标记的细胞在体内易于追踪,可观察其在体内的生长情况。本实验将 NGF 重组质粒转染至含有 GFP 的小鼠 BMSC,利用其标记特性为下一步动物移植体内示踪、定外及分布提供基础。

综上所述,本研究结果表明,构建的重组质粒载体 pcDNA3- β -NGF 成功导入含有 GFP 的小鼠 BMSC 内,转染后小鼠 BMSC 仍有增殖、分化能力,并且具有了表达 β -NGF 蛋白能力,通过以上的研究,为下一步探讨表达 β -NGF 蛋白的 BMSC 移植至体内并促进老年性耳聋听功能恢复的研究探索奠定基础,同时为疾病的基因治疗与应用提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Cort IS, Nizzardo M, Nardim M, et al. Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy[J]. Clin Invest, 2008, 118(10): 3316-3330.
- [2] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.
- [3] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow mesenchymal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(7): 364-370.
- [4] Sanchez RJ, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. Exp Neural, 2000, 164(2): 247-256.
- [5] 葛圣雷, 谢鼎华, 朱钢华, 等. 骨髓基质干细胞豚鼠内耳移植初步观察[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2005, 13(3): 177-178.
- [6] 谢鼎华, 杨伟炎, 韩德民. 听力与耳聋基础和临床现代进展[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2007: 35-37.
- [7] 许期年, 金钧, 苗宗宁. 脑源性神经生长因子促进骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2007, 27(4): 520-523.
- [8] Chai LH, Wu SX, Yan WH, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiated into dopaminergic neurons in vitro[J]. Sheng Gong Cheng Xue Bao, 2007, 23(2): 252-256.
- [9] 周琼, 汤永红. NGF 体外诱导 hMSCs 分化为神经元细胞的实验研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2008.
- [10] Du ZJ, Wang L, Lei DL, et al. Nerve growth factor injected systemically improves the recovery of the inferior alveolar nerve in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, (下转第 1167 页)

构域^[2,6]。研究 SIGIRR 的相互作用蛋白,对阐明 SIGIRR 负调控分子机制具有重要意义。本研究将包含 TIR 结构域的 SIGIRR 胞内区(480~1 230 bp)编码序列亚克隆至 CytoTrap 系统中的诱饵载体 pSos 中。经酶切、序列分析鉴定,证实正确构建了诱饵质粒 pSos-SIGIRR。将其与空载体 pMyr 共转化感受态酵母菌后,结果证明当 pMyr 质粒不表达诱饵相互作用蛋白时,cdc25H 温度敏感突变型酵母细胞不能获得在 37 ℃ 下 SD/Galactose(-UL)平板上生长的能力,Ras 途径未被激活,证明所构建的诱饵质粒不具有自激活作用;而定位检测组(pSos-SIGIRR + pMyr-SB)共转化入感受态酵母菌后,可在 37 ℃,SD/Galactose(-UL)平板上能形成菌落,提示当融合诱饵蛋白中的 Sos 与定位于细胞膜上的 SB(SoS binding protein)蛋白结合后激活了 Ras 途径,使温度突变型酵母菌 cdc25H 恢复了 37 ℃ 条件下生长的能力,提示融合诱饵蛋白 Sos-SIGIRR 表达后位于酵母菌细胞质中;且从酵母生长状态看,此诱饵质粒对酵母菌无毒性作用;Western blot 检测转化酵母菌蛋白表达情况,证明 Sos-SIGIRR 融合蛋白可稳定表达。诱饵质粒 pSos-SIGIRR 的成功构建及其自激活作用检测,为进一步利用 pSos-SIGIRR 从人肺 cDNA 文库中需找出新的与 SIGIRR 相互作用蛋白、研究 SIGIRR 的调控机制及避免实验中出现假阳性结果奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Thomassen E, Renshaw BR, Sims JE. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the il-1r superfamily[J]. Cytokine, 1999, 11 (6): 389-399.

[2] Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling[J]. Nat Immunol, 2003, 4(9): 920-927.

[3] Zhang C, Wu X, Zhao Y, et al. SIGIRR inhibits toll-like receptor 4, 5, 9-mediated immune responses in human airway epithelial cells[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(1): 601-609.

[4] 陈旭昕, 吴学玲, 陈华萍, 等. SIGIRR 过表达对 LPS 诱导的 H292 细胞 NF-κB 活性的影响[J]. 重庆医学, 2011, 40 (8): 732-734.

[5] Chen X, Zhao Y, Wu X, et al. Enhanced expression of single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule ameliorates Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Shock, 2011, 35(2): 198-204.

[6] Qin J, Qian Y, Yao J, et al. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor and toll-like receptor 4-mediated signaling

through different mechanisms[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (26): 25233-25241.

[7] 药立波, 常智杰. 医学分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 278-293.

[8] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340 (6230): 245-246.

[9] 张树民, 陈英碕. 酵母双杂交体系的新发展[J]. 国外医学遗传学分册, 1999, 22(5): 225-227.

[10] 张迪, 霍兢, 顾科隆, 等. 酵母双杂交技术进展[J]. 高技术通讯, 2000, 10(3): 98-101.

[11] 徐静, 万家余, 高宏伟, 等. 朊蛋白(prp23-231)酵母双杂交诱饵载体的构建及其自激活作用的检测[J]. 江西农业学报, 2008, 20(4): 83-85.

[12] Immink RG, Angenent GC. Transcription factors do it together: the hows and whys of studying protein-protein interactions[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(12): 531-534.

[13] Moerdyk-Schauwecker M, DeStephanis D, Hastie E, et al. Detecting protein-protein interactions in vesicular stomatitis virus using a cytoplasmic yeast two hybrid system[J]. J Virol Methods, 2011, 173(2): 203-212.

[14] Wu T, Yuan F, Chang H, et al. Identification of a novel angiogenesis inhibitor 1 and its association with hyaluronidase of streptococcus suis serotype 2[J]. Microb Pathog, 2010, 49(1/2): 32-37.

[15] 吴涛, 常海涛, 谭臣, 等. 利用酵母双杂交系统筛选与猪 2 型链球菌透明质酸酶(HYL)相互作用的蛋白质[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(9): 1149-1154.

[16] Garlanda C, Di Liberto D, Vecchi A, et al. Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling[J]. J Immunol, 2007, 179(5): 3119-3125.

[17] Xiao H, Gulen MF, Qin J, et al. The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis[J]. Immunity, 2007, 26(4): 461-475.

[18] Garlanda C, Riva F, Veliz T, et al. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family[J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6017-6021.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-12-15)

(上接第 1163 页)

2011, 49(7): 557-561.

[11] 石庆秋, 张学荣, 宋慧, 等. 广西眼镜蛇蛇毒神经生长因子基因在 NIH3T3 细胞中的表达[J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(6): 846-849.

[12] Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss[J]. Ageing Res Rev, 2002, 1(3): 331-343.

[13] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗螺旋神经元的增龄性变化[J]. 山东大学耳鼻喉眼学

报, 2008, 22(3): 215-217, 221.

[14] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗毛细胞的增龄性变化[J]. 华夏医学, 2008, 21(2): 213-215.

[15] Varghese HJ, Davidson MT, MacDonald IC, et al. Activated ras regulates the proliferation apoptosis balance and early survival of developing micromastases[J]. Cancer Res, 2002, 62(3): 887-891.

(收稿日期: 2013-10-10 修回日期: 2013-12-19)