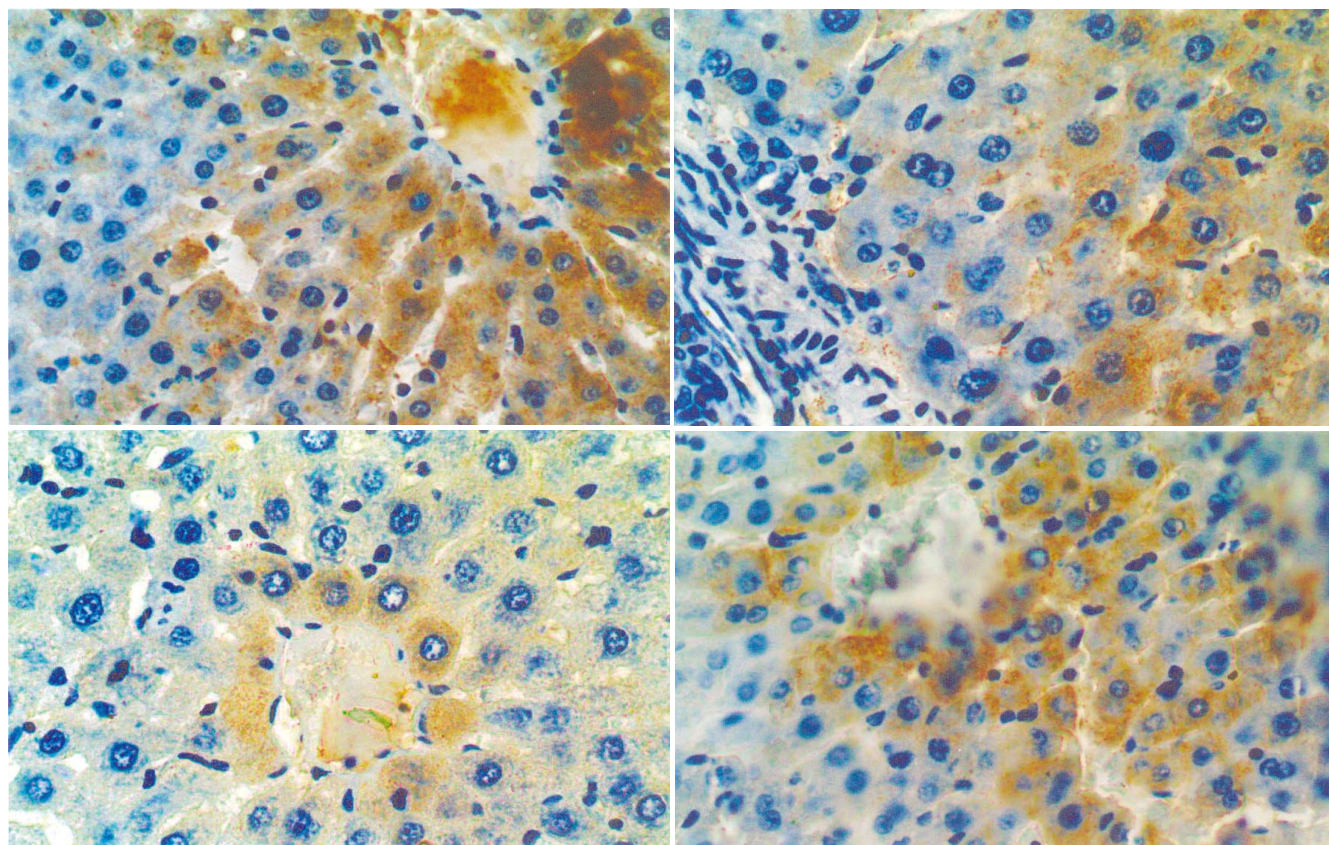


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 10 月 15 日 第 13 卷 第 19 期 (Volume 13 Number 19)



19/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2005年10月15日

第13卷

第19期

(总第147期)

述评

- 2289 胃癌表遗传学的研究进展 滕玥, 戴冬秋
2294 胃肠癌术后应用抗生素致伪膜性肠炎 马振海, 戴冬秋, 徐惠绵

基础研究

- 2297 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和Bcl-2、Bax蛋白表达的影响
贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆
2302 生存素siRNA表达质粒对MGC-803细胞增殖的影响
赵伟红, 郭俊明, 肖丙秀, 管忠, 肖东升
2306 人F3-GRIM19基因的克隆与表达 孙厚良, 刘洋, 李甲初, 曾昭淳
2310 解偶联蛋白-2在大鼠非酒精性脂肪肝中的表达
顾小红, 张云东, 冯爱娟
2314 COX-2在Barrett食管和食管腺癌中的表达及意义
刘心娟, 王邦茂, 阎雪燕, 刘文天, 吕宗舜, 张洁
2318 奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响
王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达伟, 王秀玲
2323 EB潜伏膜蛋白表达与肠上皮化生胃黏膜幽门螺杆菌感染的相关性
刘东屏, 于继红, 李茵茵, 王炳元
2327 瘦素及硬脂酰CoA去饱和酶-1在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用
陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞
2332 从肠肌间神经丛抑制性神经递质的改变探讨IBS不同亚型的发病机制
徐俊荣, 罗金燕, 尚磊, 孔武明

临床研究

- 2339 便秘型肠易激综合征结肠黏膜组织蛋白质组双向凝胶电泳分析
彭丽华, 杨云生, 孙刚, 王巍峰
2343 生理盐水冲洗提高多层CT门脉造影图像质量的临床研究 肖亮, 徐克

文献综述

- 2349 与胃癌相关的DNA甲基化研究进展 张晔, 袁媛
2355 胃肠黏膜抗损伤和修复新进展 王玮, 孙梅
2360 钙和维生素D预防结直肠癌的机制及其临床应用 陆嵘, 房静远
2364 重症急性胰腺炎并发肾损害的发病机制 张喜平, 王蕾

研究快报

- 2371 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒DNA PTP1的反式调节基因
高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖, 陶明亮
2375 活血健脾补肾法对结肠炎小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA表达的影响
张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵
2378 蜜调通关散及其拆方对家兔肠道作用机制 梁劲军, 黄阳勇, 庆方
2381 复方甘草甜素下调细胞周期素依赖性激酶1启动子表达
王志凌, 成军, 张连峰, 邵凤娟, 刘蔚, 刘妍, 陶明亮

临床经验

- 2386 内镜下双重色素法联合超声内镜对食管早期癌及癌前病变的诊断价值
刘一品, 黄留业, 李延青
2389 中医药对乙型肝炎患者肝癌前期状态的干预17例
屠红, 张菁, 成伟中, 韩镭, 陆敏, 曹宏伟, 陈复华, 耿沁
2392 奥沙拉秦钠对溃疡性结肠炎一氧化氮合酶表达的影响 郝俊鸣, 江学良, 佟艳铭
2395 应用SELDI-TOF-MS技术建立直肠癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型
闫志勇, 钱冬萌, 丁守怡, 宋旭霞, 王斌
2398 消化道肿瘤CT动脉造影分析83例 朱晓玲, 冯妹婷
2401 脐血与新鲜冰冻血浆治疗慢性重型肝炎的疗效比较
卢家桀, 唐红, 王晓辉, 刘真真, 叶慧

致 谢	2404 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2293 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2301 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2309 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2317 第一届全国临床营养支持学术会议通知 2326 2006年即将召开的国际会议 2331 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2338 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2348 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2363 首届北京地坛感染病学术会议 2385 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知
封面故事	贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆. 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(19):2297-2301 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2297.asp
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in www.isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-10-15
原刊名 新消化病学杂志

名 誉 总 编 辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编 辑 部 主 任 张海宁 中文 编 辑 潘伯荣 张海宁
英 文 编 辑 张海宁 排 版 校 对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wjgd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

October 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 19

EDITORIAL

Advancement in research of gastric cancer epigenetics

Teng Y, Dai DQ 2289

Pseudomembrane colitis induced by usage of antibiotic after gastric intestinal cancer operation

Ma ZH, Dai DQ, Xu HM 2294

BASIC RESEARCH

Effects of glutamine on glutathione content and expression of Bcl-2 and Bax protein during hepatic ischemia and reperfusion injury in rats

Jia CJ, Dai CL, Zhang X, Xu F, Cui K, XU YQ 2297

Effects of survivin siRNA expression plasmid on proliferation of MGC-803 cells

Zhao WH, Guo JM, XIAO BX, Guan Z, Xiao DS 2302

Cloning and expression of human F3-GRIM19 gene

Sun HL, Liu Y, Li JC, Zeng ZC 2306

Expression of uncoupling protein 2 in nonalcoholic fatty liver of rats

Gu XH, Zhang YD, Feng AJ 2310

Expression of COX-2 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma and its significance

Liu XJ, Wang BM, Yan XY, Liu WT, LV ZS, Zhang J 2314

Inhibitory effects of tetrandrine combined with octreotide on proliferation of gastric cancer cell lines cultured *in vitro*

Wang L, Zhu JS, Chen WX, Zhu L, Da W, Wang XL 2318

Relationship between expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein and *H pylori* infection in gastric mucosa with intestinal metaplasia

Liu DP, Yu JH, Li YY, Wang BY 2323

Roles of leptin and stearyl-CoA desaturase-1 in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by a fat-rich diet

Lu YS, Fan JG, Fang JW, Ding XD, Yang ZR 2327

Role of inhibitory neurotransmitter of myoenteric plexus in carcinogenesis of irritable bowel syndrome with different subtypes

Xu JR, Luo JY, Shang L, Kong WM 2332

CLINICAL RESEARCH

Proteomic analysis of colonic mucosa by two-dimensional gel electrophoresis in constipation-predominant irritable bowel syndrome

Peng LH, Yang YS, Sun G, Wang WF 2339

Clinical application of normal saline flush in multi-detector CT photography on portal vein

Xiao L, Xu K 2343

REVIEW

Advancement in research of gastric cancer related DNA methylation

Zhang Y, Yuan Y 2349

New advancement in rehabilitation and anti-damage of gastric intestinal mucosa

Wang W, Sun M 2355

Mechanism and clinical usage of calcium and vitamin D in prevention of rectal cancer

Lu R, Fang JY 2360

Mechanism of severe acute pancreatitis combined with renal damage

Zhang XP, Wang L 2364

BRIEF REPORT

Cloning of hepatitis B virus DNA PTP1 transactivating genes by suppression subtractive hybridization technique

Gao XS, Cheng J, Zhen Z, Guo J, Zhang LY, Tao ML 2371

Effects of *Huoxue*, *Jianpi* and *Bushen* recipe on expression of TNF- α and its mRNA in mice with colitis

Zhang YF, Chen RS, Wu ZZ, Li M, Chen MY 2375

Effects of *Mitiao Tongguansan* decoction and its different ingredients on function of intestinal tract in rabbits

Liang JJ, Huang YY, Qing F 2378

Down-regulatory effects of glycyrrhizin on expression of cyclin-dependent kinase 1 gene promoter

Wang ZL, Cheng J, Zhang LF, Shao FJ, Liu W, Liu Yan, Tao ML 2381

CLINICAL PRACTICE

Evaluation of double staining combined with endosonography in detection of early esophageal cancer and precancerous lesions

Liu YP, Huang LY, Li YQ 2386

Traditional Chinese Medicine intervention for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: an analysis of 17 cases

Tu H, Zhang J, Cheng WZ, Han L, Lu M, Cao HW, Chen FH, Geng Q 2389

Effects of olsalazine sodium on expression of nitric oxide synthase in patients with ulcerative colitis: an analysis of 36 cases

Hao JM, Jiang XL, Tong YM 2392

Establishment of serum protein pattern model for screening rectal carcinoma by SELDI-TOF-MS

Yan ZY, Qian DM, Ding SY, Song XX, Wang B 2395

Analysis of artery computed tomography angiography for digestive tumor in 83 cases

Zhu XL, Feng ST 2398

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly
Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date October 15, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology
PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation
PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

人 F3-GRIM19 基因的克隆与表达

孙厚良, 刘洋, 李甲初, 曾昭淳

孙厚良, 刘洋, 李甲初, 曾昭淳, 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室 重庆市 400016
孙厚良, 男, 1975-08-10生, 重庆市人, 汉族, 重庆医科大学生物化学与分子生物学硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。
重庆市教委资助项目, No.1
通讯作者: 曾昭淳, 400016, 重庆市, 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室: zengzc88@yahoo.com.cn
电话: 023-68485398
收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-06

Cloning and expression of human F3-GRIM19 gene

Hou-Liang Sun, Yang Liu, Jia-Chu Li, Zhao-Chun Zeng

Hou-Liang Sun, Yang Liu, Jia-Chu Li, Zhao-Chun Zeng, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China
Supported by Program of Educational Administration of Chongqing, No.1
Correspondence to: Dr. Zhao-Chun Zeng, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China. zengzc88@yahoo.com.cn
Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-06

Abstract

AIM: To clone the cDNA of genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19(GRIM19), and to construct the F3-GRIM19 expression vector.

METHODS: The total RNA was extracted from normal placenta tissues, and the GRIM19 cDNA was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the pQE30-F3-GRIM19 expression vector was constructed and sequenced. Thus, the fusion protein of F3-GRIM19 was expressed in *E. coli* and purified using Ni²⁺-NTA agarose resin.

RESULTS: After sequencing, the pQE30-F3-GRIM19 contained 580 bp insert, which was consistent with the F3-GRIM19 sequence in GenBank. The expression of the fusion protein (*M_r* 25 000) was at the highest level 4-5 h after induced by Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), which accounted for 25% in *E. coli*. After purification, the purity of the target protein was above 90%, and the recovery rate was 17.3%.

CONCLUSION: The F3-GRIM19 prokaryotic expression vector is successfully constructed, and the target protein

was expressed and highly purified.

Key Words: GRIM19 cDNA; Clone; Expression; Purification

Sun HL, Liu Y, Li JC, Zeng ZC. Cloning and expression of human F3-GRIM19 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(19):2306-2309

摘要

目的: 克隆GRIM19基因, 并构建F3-GRIM19表达载体。

方法: 从正常人胎盘组织中克隆GRIM19的cDNA, 并构建了F3-GRIM19表达载体, 测序正确后, 表达并亲和层析纯化F3-GRIM19融合蛋白。

结果: 克隆后测序, 发现其含有约580 bp的插入片段, 基因与GenBank序列完全一致, 读码框正确。在大肠杆菌中表达*M_r* 25 000的F3-GRIM19蛋白, 灰度值分析表达量约占菌体总蛋白的25%。经纯化, 目的蛋白纯度达90%, 复性率为17.3%。

结论: 成功构建了F3-GRIM19原核表达载体, 并成功表达纯化了目的蛋白。

关键词: GRIM19基因; 克隆; 表达; 纯化

孙厚良, 刘洋, 李甲初, 曾昭淳. 人F3-GRIM19基因的克隆与表达. 世界华人消化杂志 2005;13(19):2306-2309
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2306.asp>

0 引言

实验证明, 人类多数肿瘤细胞中均有STAT3持续表达, 且活性高于正常。持续激活的STAT3可导致细胞恶性增生、抗凋亡、维持新血管生成和逃脱免疫监视; 阻断持续激活的STAT3信号通路能有效抑制肿瘤细胞增生、诱导其凋亡、刺激免疫应答以及抑制新血管生成。所以STAT3被认为是癌症治疗上最有前景的分子靶点之一^[1,2]。GRIM19(genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19)能特异性与STAT3直接结合, 阻断细胞质中的STAT3进入细胞核, 从而下调细胞核中STAT3转录激活活性, 抑制其靶基因的表达及细胞生长^[3-5]。编码人类高迁移组蛋白2(HMGN2)N端31个氨基酸的F3肽能将其携带的噬菌

体或绿色荧光蛋白特异性靶向肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞, 并穿过细胞膜进入细胞质和细胞核^[6]. 所以可以利用F3肽作为靶向肿瘤的药物载体, 用于肿瘤的靶向治疗. 为此, 把编码GRIM19的DNA连接于编码F3肽的DNA的3'端, 表达F3-GRIM19融合肽, 为研究其抑制肿瘤的机制打下基础, 对进一步开发新一代抗肿瘤药物具有重大的理论和实际意义.

1 材料和方法

1.1 材料 胎盘组织取自正常产妇剖腹手术切除的新鲜胎盘组织; 原核表达载pET32a(+)和pQE30由本室保存; Trizol RNA抽提试剂为Invitrogen公司产品; 限制性内切酶及高保真Pyrobest酶、dNTP及IPTG购于宝生物工程(大连)有限公司; T₄ DNA连接酶购于Promega公司; RT试剂盒购于Qiagen公司. 根据Genbank AF286697号编码GRIM19全长序列由软件设计引物, 正向引物P1: 5'-GAGAATTCATGGCGCGCTCAAAGG-3'(EcoR I); 逆向引物P2: 5'-GAAGCTT CAGGGCCTACGTGTACCACAT-3'(Hind III). 根据F3肽全长序列设计引物, 逆向引物加6个甘氨酸作柔性连接于GRIM19的N端(黑体部分), 正向引物Pa: 5'-CGCCCTGCCATGGACAAAGATGAACCGCAACGTC-3'(Nco I) 逆向引物Pb: 5'-CGGAATTCACCACCACCACCACCA C C C T T C T T A G C C G G T G C T T T T - 3' (Eco R I).

1.2 方法 取正常人胎盘组织, 按Trizol试剂的操作说明抽提总RNA, 1 g/L DEPC处理的15 g/L的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性. RT-PCR扩增人GRIM19的cDNA, 20 μL逆转录体系如下: 10×Buffer 2.0 μL, dNTP 2.0 μL, primer 0.8 μL, Rnase inhibitor 1.0 μL, AMV RT 1.0 μL, Rnase-free water 9.2 μL, 总RNA(Up to 2 μg)4 μL; 37℃水浴保温60 min之后, 直接进行PCR. 50 μL PCR体系如下: ddH₂O 35.75 μL, 10×PCR buffer 5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)5 μL, P1(25 μmol/L)1 μL, P2 1 μL, cDNA 2 μL, Pyrbest聚合酶0.25 μL; 反应条件: 94℃预变性4 min; 94℃变性40 s, 63℃退火40 s, 72℃延伸40 s, 共30个循环, 72℃总延伸10 min; 反应结束后取5 μL产物在12 g/L的琼脂糖凝胶中电泳, 鉴定扩增出与预期大小的DNA片段后, 进行PCR产物纯化. 将质粒pET32a(+)及RT-PCR产物经EcoR I 和Hind III双酶切后, 分别纯化回收, 4℃连接酶连接24 h, 将连接产物转化感受态的大肠杆菌DH5α, 氨苄抗性筛选阳性克隆, 提取质粒, 限制性内切酶酶切鉴定重组质粒, 阳性克隆命名为pET32a-GRIM19, 送上海生工测序.

1.2.1 pET32a-F3-GRIM19表达载体的构建 以含F3全长序列的质粒pEKH-F3为模板扩增F3的DNA片断, 扩

增体系和条件同上. 将质粒pET32a-GRIM19及F3的PCR产物经Nco I 和EcoR I 双酶切后, 分别纯化回收, 连接、筛选、鉴定, 阳性克隆命名为pET32a-F3-GRIM19, 送上海生工测序.

1.2.2 亚克隆构建pQE30-F3-GRIM19重组载体 将质粒pET32a-F3-GRIM19及pQE30经Kpn I /Hind III双酶切后, 分别纯化回收pET32a-F3-GRIM19酶切小片段及pQE30酶切大片段, 连接、转化、筛选, 阳性克隆命名为pQE30-F3-GRIM19.

1.2.3 重组F3-GRIM19的表达及表达产物鉴定 pQE30-F3-GRIM19转化感受态大肠杆菌表达株SG13009, 挑取在卡拉霉素和氨苄平板生长良好的单克隆, 37℃液体振荡培养至A₆₀₀至1.0, 加IPTG至终浓度1 mmol/L, 继续培养4 h, 诱导目的蛋白的表达. 收集培养上清和菌体, 菌体进行超声破碎, 离心, 分别收集上清和沉淀, SDS-PAGE(150 g/L分离胶和50 g/L积层胶)分析目的蛋白表达的部位和含量. 因pQE30载体表达的目的蛋白N端含6个组氨酸(His)标签, 故可用抗聚His单抗的Western blot鉴定表达产物, 步骤如下: 表达产物SDS-PAGE, 电转移至PVDF膜, 50 g/L 脱脂奶粉封闭1 h, 抗His标签单抗孵育1 h, HRP标记的羊抗小鼠IgG孵育1 h, 每步完成后均洗膜3次, 最后DAB显色.

1.2.4 Ni²⁺-NTA亲和层析纯化F3-GRIM19 融合蛋白含6个组氨酸的标签, 故表达产物可用Ni²⁺-NTA琼脂糖树脂进行纯化. pQE30-F3-GRIM19大量诱导表达后, 离心收集菌体, 超声破碎后, 离心沉淀包涵体. 20 mL/L TritonX-100和2 mol/L Urea洗涤包涵体4-5次, Buffer A(0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L imidazole, 20 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L Urea, pH7.9)冰浴溶解包涵体, 溶解上清用0.45 μm滤膜过滤, 滤液上Ni²⁺-NTA树脂层析柱. Buffer A和Buffer B(含60 mmol/L imidazole的Buffer A)洗柱, Buffer C(含1 mol/L imidazole的Buffer A)洗脱目的蛋白. 纯化蛋白经梯度透析复性后, Bradford法测定蛋白浓度, 冷冻干燥保存.

2 结果

2.1 RT-PCR扩增人GRIM19 cDNA和F3肽DNA片段 RT-PCR扩增得一长约450 bp DNA片段, 与预期GRIM19片段大小一致(图1). 质粒pEKH-F3为模板, PCR扩增得一长约130 bp DNA片段, 与预期F3片段大小一致(图2).

2.2 pQE30-F3-GRIM19表达载体的构建、筛选与鉴定 pQE30-F3-GRIM19经过鉴定(图3), 结果获得了插入片段的阳性克隆, 插入片段约为580 bp, 与预期的F3-GRIM19基本一致. 测序结果与文献报道序列一致, 而且读码框正确.

2.3 重组F3-GRIM19的表达及鉴定 表达载体在表达菌

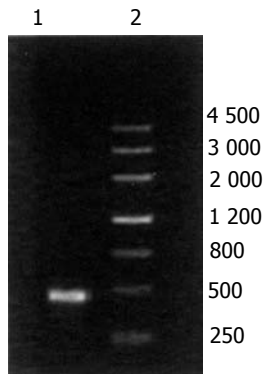


图1 RT-PCR的琼脂糖凝胶电泳结果. 1: RT-PCR 产物; 2: DNA marker.

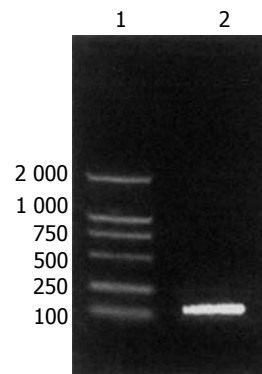


图2 F3肽的PCR结果. 1: DNA maker; 2: F3 PCR 扩增产物.

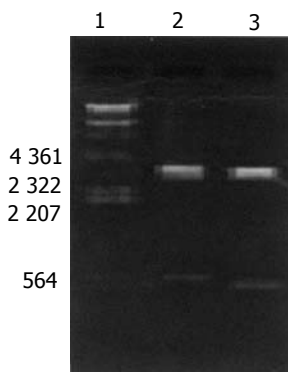


图3 重组pQE30-F3-GRIM19质粒酶切鉴定. 1: DNA maker; 2: pQE30-F3-GRIM19/*Nco* I + *Hind* III; 3: pQE30-F3-GRIM19/*Eco*R I + *Hind* III.

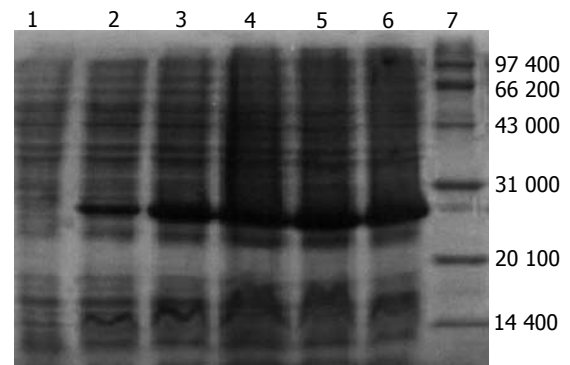


图4 不同时间下pQE30-F3-GRIM19的表达. 1: 未诱导pQE30-F3-GRIM19; 2-6: 诱导1-5 h pQE30-F3-GRIM19; 7: Protein molecular weight.

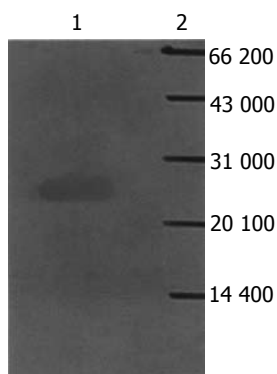


图5 免疫印迹分析表达产物. 1: F3-GRIM19融合蛋白; 2: Protein molecular weight.

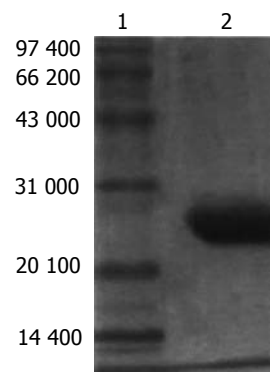


图6 重组表达蛋白F3-GRIM19的纯化图. 1: Protein molecular weight; 2: 纯化的F3-GRIM19融合蛋白.

中以37℃, 1 mmol/L IPTG, 诱导表达4-5 h表达量达最大. 菌体裂解后取上清和沉淀行SDS-PAGE, 分析表明融合蛋白以包涵体形式表达; M_r 25 000. 灰度值分析表达量约占菌体总蛋白的25%(图4). Western blot只在 M_r 25 000处显色, 分析表明表达产物为目的蛋白(图5).

2.4 重组蛋白的纯化复性 目的蛋白经 Ni^{2+} -NTA树脂纯化及稀释透析复性后进行SDS-PAGE, 结果纯度达90%以上(图6), 复性率为17.3%.

3 讨论

GRIM19是2000年由Angell *et al*^[3]筛选出的一个新死亡

相关基因, 他的高表达能抑制肿瘤细胞的增殖, 促进细胞的凋亡. 2003年Zhang *et al*^[4]发现GRIM19直接特异性作用于STAT3, 阻断STAT3的下游活性. 细胞实验显示GRIM19以剂量依赖性抑制肿瘤细胞的生长, 而对正常细胞影响甚小. 分析表明, GRIM19的36-72位氨基酸是与STAT3结合阻止其进入细胞核的功能部位^[5]. GRIM19主要分布于线粒体, 少量分布于细胞质和细胞核内, 受干扰素等刺激后表达量增加, 且迅速进入细胞核^[7]. F3的肿瘤细胞靶向性及内在化作用为蛋白GRIM19提供了很好的肿瘤靶向载体, 所以我们将F3与GRIM19柔性连接起来, 构建F3-GRIM19表达

载体. 还可进一步将GRIM19连接于F3肽的N端. 利用6个甘氨酸将F3与GRIM19柔性连接是为了使融合蛋白中F3片段和GRIM19各自都更好的保持其正确的空间构象和生物学活性. pQE30是高效的原核融合表达载体, 融合部分只有6×His标签, 一般不对目的蛋白的结构和功能产生影响, 而且便于表达产物的鉴定和纯化.

期望GRIM19在F3肽的引导下, 靶向肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞, 并进入细胞质和细胞核内, 与STAT3结合, 发挥其抗肿瘤作用. 所以, 目的蛋白F3-GRIM19的表达为其生物学活性检测作好了物质准备, 通过对不同肿瘤的抑制, 筛选出灵敏高效的肿瘤类型, 有望开发出新型的肿瘤靶向治疗制剂.

4 参考文献

- 1 Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 97-105
- 2 Frank DA. STAT signaling in cancer: insights into pathogenesis and treatment strategies. *Cancer Treat Res* 2003; 115: 267-291
- 3 Angell JE, Lindner DJ, Shapiro PS, Hofmann ER, Kalvakolanu DV. Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach. *J Biol Chem* 2000; 275: 33416-33426
- 4 Zhang J, Yang J, Roy SK, Tininini S, Hu J, Bromberg JF, Poli V, Stark GR, Kalvakolanu DV. The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9342-9347
- 5 Lufei C, Ma J, Huang G, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Ong CT, Cao X. GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. *EMBO J* 2003; 22: 1325-1335
- 6 Porkka K, Laakkonen P, Hoffman JA, Bernasconi M, Ruoslahti E. A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7444-7449
- 7 Huang G, Lu H, Hao A, Ng DC, Ponniah S, Guo K, Lufei C, Zeng Q, Cao X. GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8447-8456

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

本刊讯 世界华人消化杂志主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289)统计, 世界华人消化杂志 2003 年发表文章 594 篇, 地区分布 25 个, 机构分布 191 个, 基金论文比 31%, 总被引频次 5249 次, 影响因子 2.924, 即年指标 0.529, 引用期刊数 260 种, 被引半衰期 3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有 51 种, 统计到的文献数量共计 9435301 篇次, 涉及期刊 39893 种次. 参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊. 世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘 (Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志 (Abstracts Journals)》收录。

世界华人消化杂志 2006 年由北京报刊发行局发行, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号 82-262, 出版日期 8, 18, 28 日, 页码 160, 月价 72.00. (世界胃肠病学杂志社 2005-06-29)