

# 氚宫内照射对大鼠神经细胞分布及脑机能的影响

姚晓波<sup>1</sup>, 王永生<sup>1</sup>, 邱俊<sup>2</sup>, 吴翠萍<sup>3</sup>, 陶新全<sup>4</sup>, 王明明<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨氚水宫内照射对仔鼠脑神经细胞迁移和脑机能的影响。方法 雌性 SD 大鼠孕龄第 10 天 (E10) 一次性腹腔注射  $3.7 \times 10^6$  Bq/(g 体液) 氚水, 孕龄 E18 及出生后当天 (P0) 取部分仔鼠脑标本, 用免疫组织化学法检测大脑皮质神经细胞黏附分子 NCAM、L1 表达情况, 观察氚  $\beta$  射线内照射对神经细胞迁移的影响; 出生后 38 ~ 42 d 龄利用 Morris 水迷宫测量氚  $\beta$  辐射对仔鼠脑机能的影响; P90 利用氢质子磁共振波谱 (<sup>1</sup>H-MRS) 检测仔鼠大脑内 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA) 及胆碱类化合物 (Cho) 分别与肌酸类化合物 (Cr) 比值, 分析氚辐射引发脑神经细胞与神经胶质细胞分布的改变。结果 ① 免疫组织化学分析表明, 与对照比较, E18 及 P0 受照鼠脑内神经细胞黏附分子 NCAM、L1 的表达量均减小 ( $P < 0.05$ ); ② Morris 水迷宫检测显示, 受照鼠逃避潜伏期较对照明显延长 ( $P < 0.05$ ); 空间探索试验中, 受照鼠在平台象限停留时间明显低于对照 ( $P < 0.05$ ); ③ <sup>1</sup>H-MRS 检测显示, 受照鼠脑中 NAA/Cr 比值较对照明显降低 ( $P < 0.05$ ), 两组间 Cho/Cr 比值的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) 表明氚  $\beta$  射线照射改变了脑内神经细胞与神经胶质细胞的相对比例, 即辐射影响了脑内细胞分布。结论 氚水宫内照射可下调仔鼠脑内与神经细胞迁移相关的神经细胞黏附分子 NCAM、L1 的表达, 妨碍神经细胞正常迁移, 导致脑内神经细胞分布异常, 诱发仔鼠脑机能障碍。

**关键词** 氚水; 电离辐射; 神经细胞迁移; Morris 水迷宫; 氢质子磁共振波谱

中图分类号 R 811.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1371-05

近年来, 受日本福岛核事故影响, 核电站释放废物所致生物与环境危害再次引发世人关注。随着世

界核电的发展, 氚的排放量日益增多, 氚可转化为氚水进入自然水体, 经食物链进入动物和人体内, 其发射的  $\beta$  射线可致机体发育异常。神经组织对电离辐射特别敏感<sup>[1]</sup>, 研究<sup>[2]</sup>表明电离辐射能阻碍神经细胞正常迁移, 破坏神经细胞间正确联系, 干扰脑发育, 使其结构异常, 机能发育延迟和低下。该研究从大脑神经细胞黏附分子表达和行为学变化及脑神经细胞分布改变等角度进行研究, 探讨氚水宫内照射对仔鼠脑机能的影响及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物与试剂** SPF 级 SD 大鼠, 体重 (200 ± 20) g, 雌雄各 10 只, 购自常州卡文斯实验动物有限公司。氚水购自中科院上海应用物理研究所; 兔抗 NCAM、L1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.1.2 实验器材** 实验动物取脑手术器械一套 (上海医疗器械有限公司); 光学显微镜 (OLYMPUS, 日本); Morris 水迷宫 (中国医学科学院药物研究所); GESigna-HDxt 3.0T MRI 仪 (GE 公司, 美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组与建模** 20 只 SD 大鼠, 随机选择配对, 共配 10 对, 于 18:00 时按配对合笼, 次日 8:00 前查栓, 发现母鼠阴栓之日为受孕 0 d (E0) 作为妊娠的开始, 仔鼠出生当日为生后 0 d (P0)。将 E10 母鼠随机分为实验组和对照组各 5 只, 实验组一次性腹腔注射  $3.7 \times 10^6$  Bq/(g 体液) 氚水, 对照组注射等体积生理盐水。E18 及 P0 每组各处死 4 只仔鼠, 开颅取脑, 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液中浸泡固定 24 h。剩余的两组仔鼠, P38 各选出 9 只 (性别比一致) 体重相近的用于 Morris 水迷宫实验, P90 各选出 12 只 (性别比一致) 进行氢质子磁共振波谱 (proton magnetic resonance spectroscopy, <sup>1</sup>H-MRS) 检测。

**1.2.2 免疫组织化学染色及结果判断** 取脑组织, 4% 多聚甲醛固定, 切除小脑, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 连续 3  $\mu$ m 厚冠状面切片, 用 EnVision 法进行免

2014-05-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81273003); 安徽省自然科学基金 (编号: 1208085MH162); 安徽省教育厅自然科学基金 (编号: KJ2011Z162); 安徽省教学质量工程项目 (编号: 2010941)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学临床医学院放射医学研究所, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽省第二人民医院 MRI 室, 合肥 230001

<sup>3</sup>肥东县人民医院呼吸科, 合肥 230001

<sup>4</sup>蚌埠医学院第一附属医院核医学科, 蚌埠 233004

作者简介: 姚晓波, 男, 主治医师, 硕士研究生;

陶新全, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: taoxinquan66@163.com;

王明明, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wmgeme@163.com

疫组化染色 同时设阴性对照,每个鼠脑组织取3张切片,用光学显微镜观察大脑皮质神经细胞黏附分子 NCAM、L1 表达情况。NCAM、L1 表达定位于细胞质和(或)细胞膜,呈黄色颗粒状或网状,采用阳性细胞数评分和染色强度评分综合确定。阳性细胞数评分标准为:0分为阳性细胞数 < 25%,1分为阳性细胞数 25% ~ 50%,2分为阳性细胞数 51% ~ 75%,3分为阳性细胞数 > 75%;阳性染色强度评分标准为:0分为阴性,与背景色完全一致;1分为弱阳性染色,呈淡黄色,略深于背景色;2分为阳性染色,呈中等黄色,明显深于背景色;3分为强阳性染色,呈棕黄色或棕褐色。每张切片总评分等于阳性细胞数评分 + 阳性染色强度评分。

1.2.3 Morris 水迷宫检测 水迷宫由1个不锈钢喷塑圆柱形水池和图像采集分析系统两部分组成,水池直径160 cm、高50 cm,按东南西北4个方向将水池平均划分为4个象限(NE、SE、SW、NW),一直径为10 cm透明的平台固定于第3象限(位置为第3象限45°平分线的中点),池壁圆弧中点为可选的动物入水点。

1.2.3.1 逃避潜伏期试验 每次分别从4个象限入水点面朝壁入水,在90 s内找到平台的时间为逃避潜伏期,图像自动监视系统追踪大鼠的游泳轨迹,记录大鼠寻找固定平台的时间(潜伏期)。如果大鼠找到平台,记录实际找到的时间并允许其在平台上停留15 s;如果90 s内未找到平台,则记录为90 s,并用小木棍将其引导至平台上停留15 s。平台停留后放入笼中休息10 ~ 20 min,然后进行下一次测试,4次成绩的平均值为当日成绩,连续4 d,实验于每天14:00 - 16:00进行。

1.2.3.2 空间探索试验 第5天进行空间探索试验,以检测大鼠对平台空间位置的记忆能力。空间探索试验时撤除平台,任选一个入水点将大鼠放入水中,记录大鼠1 min内的游泳轨迹,计算大鼠在原平台象限游泳时间。

1.2.4 <sup>1</sup>H-MRS 检查 采用GE Signa-HDxt 3.0T超导型磁共振成像系统,射频线圈为体线圈,接受线圈为GE公司提供的8.89 cm眼线圈。用10%的水合氯醛(3 ml/kg 体重)腹腔注射麻醉后,置于线圈内,固定头部,行轴位、矢状位、冠状位 SE T1WI 定位像,然后轴位 FSE 序列 T2WI,TR 2 500 ms,TE 135 ms,层厚 3 mm,间隔为 0,层数 9 层,FOV 19, NEX 2,通常可获得6层满意轴位图。于轴位 T2WI 选正中最大层面(以尽量避开颅壁及颅底结构的影响),以大脑胼胝体部位为中心行单体素<sup>1</sup>H-MRS,

体素大小为 6 mm × 8 mm × 10 mm。采用点分辨波谱(point resolved spectroscopy, PRESS),128次激励,8次压水抑制扫描,其余均由自动预扫描程序完成,获得单体素<sup>1</sup>H-MRS。

应用机器自身条件进行相位和基线的校正,并计算各峰的峰下面积,根据化学位移确定各化合物对应的峰面积,以此估算该化合物的浓度;分析各化合物的峰值和比值,包括 N-乙酰天门冬氨酸(N-acetylaspartate, NAA)值峰,胆碱化合物(choline-containing compounds, Cho)峰值,肌酸(creatine, Cr)峰值,Cho/Cr 比值, NAA/Cr 比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组之间进行两独立样本 *t* 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$  (双侧)。

2 结果

2.1 仔鼠体内氙水 β 射线照射所致吸收剂量( absorbed dose, D) 单次注入氙水,体内氙水浓度平衡后随时间呈指数规律减小。从注入氙水至胎鼠出生时间为 11.5 d,仔鼠出生后受体体内氙水照射时间 90 d,分别算得胎鼠受母体及自身体内氙水照射的吸收剂量  $D_{胎}$  为 1.194 Gy,仔鼠从出生后至 90 d 龄受体氙水照射的吸收剂量  $D_{仔}$  为 0.095 Gy,仔鼠吸收剂量为出生前后受照剂量之和  $D = D_{胎} + D_{仔} = 1.289$  Gy。

2.2 免疫组织化学染色 大鼠脑皮质神经细胞黏附分子 NCAM、L1 定位于细胞膜和(或)细胞质,呈棕黄色颗粒或网状分布。E18 及 P0 受照鼠大脑皮质神经细胞黏附分子 NCAM、L1 的表达量均低于对照(E18:  $t = 5.617, 5.566, P < 0.05$ ; P0:  $t = 11.443, 5.265, P < 0.05$ )。见图 1、2 表 1。

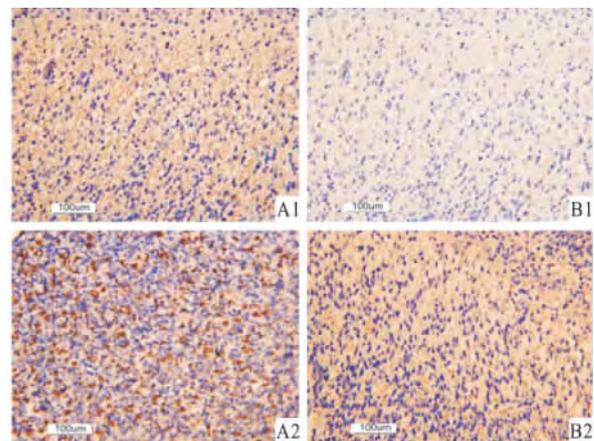


图1 E18神经细胞黏附分子 NCAM、L1 的表达情况 免疫组化 ×400  
A:对照组;B:实验组;1: NCAM;2:L1

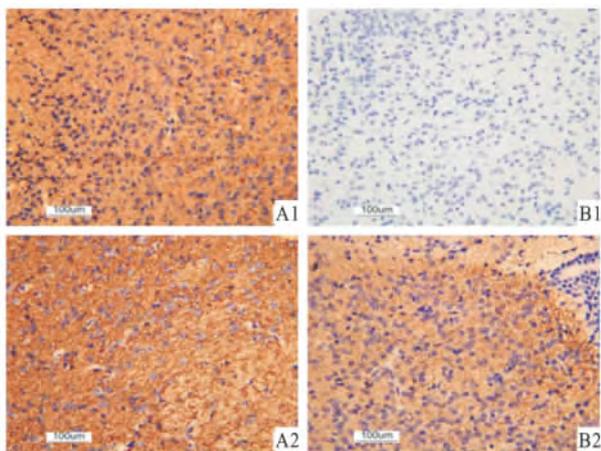


图2 P0 神经细胞黏附分子 NCAM、LI 的表达情况 免疫组化 ×400  
A:对照组;B:实验组;1: NCAM;2:LI

表1 两组间不同时间点大脑皮质 NCAM、LI 的免疫组化综合评分值的比较 (n = 12  $\bar{x} \pm s$ )

组别	E18		P0	
	NCAM	LI	NCAM	LI
对照	3.83 ± 1.03	4.58 ± 0.51	3.42 ± 0.66	3.92 ± 1.08
实验	1.25 ± 1.21*	2.92 ± 0.90*	0.33 ± 0.65*	2.17 ± 0.38*

与对照组比较: \* P < 0.05

**2.3 Morris 水迷宫检测** 实验组母鼠腹腔注射  $3.7 \times 10^6$  Bq/(g 体液) 氚水, 仔鼠出生后出现明显的空间学习记忆障碍, 表现为逃避潜伏期较对照组明显延长 ( $t = -2.218, P < 0.05$ ), 空间探索试验中, 实验组平台象限停留时间明显低于对照组 ( $t = 2.625, P < 0.05$ )。见表 2。

**2.4 大脑代谢物水平的<sup>1</sup>H-MRS 检测** 氚 β 射线照射后, 整个波谱发生了变化, NAA 峰高明显下降, Cho 和 Cr 峰高轻度下降, 见图 3、4。<sup>1</sup>H-MRS 检测到的 NAA/Cr 均值从对照组的  $1.0900 \pm 0.1700$  减至实验组的  $0.7427 \pm 0.3989$ , 下降明显 ( $t = 2.774, P < 0.05$ ); 对照组 Cho/Cr 均值为  $1.1828 \pm 0.2120$ , 实验组为  $1.3032 \pm 0.1849$ , 两组间差异无统计学意义。

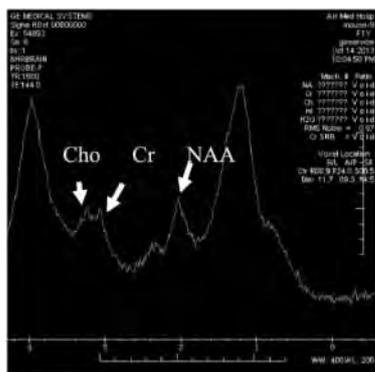


图3 对照组<sup>1</sup>H-MRS 图

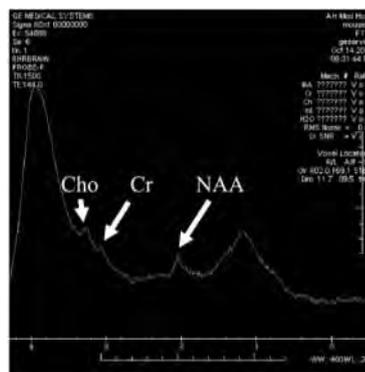


图4 实验组<sup>1</sup>H-MRS 图

表2 两组仔鼠逃避潜伏期和平台象限停留时间的比较 (n = 9  $\bar{x} \pm s$ )

组别	逃避潜伏期 (s)	平台象限停留时 (s)
对照	31.331 ± 25.911	32.533 ± 10.758
实验	38.631 ± 29.796*	22.189 ± 4.901*

与对照组比较: \* P < 0.05

### 3 讨论

发育中的脑对辐射特别敏感。研究<sup>[3]</sup>表明妊娠期受照可导致出生后儿童智力障碍的发生率增加。实验<sup>[4]</sup>提示大鼠在妊娠第 11 天受 0.15 Gy 剂量照射对仔鼠的学习记忆行为已有损害。既往研究<sup>[5]</sup>显示, 氚水 β 辐射可抑制体外培养神经细胞中 NCAM 等迁移相关因子的表达, 阻碍神经细胞迁移。

NCAM、LI 属于免疫球蛋白超家族。NCAM 可通过参与同源性和异源性细胞间相互作用来调节神经细胞轴突生长、迁移<sup>[6]</sup>。LI 主要参与大脑皮层颗粒细胞迁移及髓鞘形成<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明电离辐射可导致 NCAM、LI 表达降低, 神经细胞迁移障碍。本研究显示氚水宫内照射后 E18 及 P0 仔鼠大脑皮质 NCAM、LI 的表达减少, 而大鼠皮层神经细胞迁移发生在 E12 ~ P1, 故 E18 ~ P0 期仔鼠受照可能会影响皮层神经细胞迁移。

此外, 神经细胞黏附分子 NCAM、LI 与学习记忆过程关系密切<sup>[9]</sup>。故本研究 Morris 水迷宫测试所反映的受照仔鼠学习记忆能力受损直接与鼠脑发育过程中 NCAM 和 LI 表达降低关系密切。

Morris 水迷宫是测定大鼠智力发育状况的常用方法。本研究表明宫内受 1.289 Gy 氚水照射后, 仔鼠逃避潜伏期延长, 平台象限停留时间明显低于对照, 提示照射使其脑机能异常致空间学习记忆能力明显受损; 这与 Wang et al<sup>[10]</sup>的研究结果类似。

<sup>1</sup>H-MRS 可用于检测体内多种化合物, 如 NAA、Cho 及 Cr 等。一般认为 Cr 在脑组织内的含

量比较稳定,常用于计算相对浓度比值的参照物,如 NAA/Cr、Cho/Cr<sup>[11]</sup>。NAA 主要存在于神经细胞内,其含量多少可以反映神经细胞的数量与功能状况<sup>[12]</sup>。Cho 是细胞膜合成和细胞分裂的标志物<sup>[11]</sup>,胶质细胞中胆碱含量明显高于神经细胞,所以胆碱浓度改变主要反映了胶质细胞数的变化。

NAA/Cr、Cho/Cr 值变化可反映脑内神经细胞与神经胶质细胞相对比例及分布的改变。受照仔鼠大脑皮质内 NAA/Cr 较对照鼠减小,而其 Cho/Cr 与对照鼠差异无统计学意义,表明受照鼠脑皮质内神经细胞与神经胶质细胞相对比例和分布发生了变化。这种变化源自两方面:① 射线照射杀死早期迁移到皮层的神经细胞;② 辐射影响神经细胞迁移<sup>[5]</sup>,使其不能正常到达大脑皮层。资料<sup>[13]</sup>表明放疗可使鼻咽癌患者颞叶单位体积内神经细胞密度降低,体素内测得的 NAA、NAA/Cr 下降,这与本研究结果类似。辐射及其他环境毒素引发的脑神经细胞迁移障碍可分为无脑回畸形、多发小脑回畸形、脑裂畸形、灰质异位及皮质发育不全等。Otake et al<sup>[14]</sup>对 5 名患严重智力障碍的原爆幸存者脑部进行磁共振检查,发现两名孕 8 或 9 周宫内受照者脑内有较大范围的灰质异位,提示神经细胞迁移障碍。本研究 MRS 检查神经细胞分布的 NAA/Cr 指标下降反映出受照鼠由于神经细胞黏附分子 NCAM、L1 表达减少导致神经细胞迁移障碍,而受照鼠学习记忆能力受损也正是氚宫内照射所致神经细胞迁移障碍引发脑机能异常的一个表现。

综上所述,氚水 β 射线宫内照射可下调仔鼠脑内神经细胞黏附分子 NCAM、L1 的表达,妨碍神经细胞正常迁移,导致脑内神经细胞分布异常,诱发仔鼠脑机能障碍。

### 参考文献

[1] Manda K, Reiter R J. Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive function after irradiation [J]. *Prog Neuro-*

*biol* 2010, 90(1):60-8.  
 [2] Sun X Z, Takahashi S, Cui C, et al. Normal and abnormal neuronal migration in the developing cerebral cortex [J]. *J Med Invest*, 2002, 49(3-4):97-110.  
 [3] J Valentin. Human evidence on the effects of in-utero radiation exposure on neurological and mental processes [M]//ICRP Publication 90: Biological Effects after Prenatal Irradiation (Embryo and Fetus). Oxford: Pergamon Press Ltd, 2003: 103-22.  
 [4] 郭月风, 杨志远, 刘静雯, 等. 出生前照射对大鼠学习记忆行为的影响及其机制探讨 [J]. *辐射防护*, 1995, 15(4):281-5.  
 [5] 蔡二朋, 邱俊, 王永生, 等. 甲状腺激素对氚致神经元迁移障碍的改善作用 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2012, 32(6):588-92.  
 [6] Schmid R S, Maness P F. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth [J]. *Curr Opin Neurobiol* 2008, 18(3):245-50.  
 [7] Cohen N R, Taylor J S, Scott L B, et al. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1 [J]. *Curr Biol*, 1998, 8(1):26-33.  
 [8] Sun X Z, Zhang R, Cui C, et al. Expression of neural cell adhesion molecule L1 in the brain of rats exposed to X-irradiation in utero [J]. *J Med Invest* 2003, 50(3-4):187-91.  
 [9] Welzl H, Stork O. Cell adhesion molecules: key players in memory consolidation? [J]. *News Physiol Sci*, 2003, 18(4):147-50.  
 [10] Wang B, Zhou X Y. Effects of prenatal exposure to low-dose beta radiation from tritiated water on the neurobehavior of mice [J]. *J Radiat Res*, 1995, 36(2):103-11.  
 [11] Elias A E, Carlos R C, Smith E A, et al. MR spectroscopy using normalized and non-normalized metabolite ratios? for differentiating recurrent brain tumor from radiation injury [J]. *Acad Radiol*, 2011, 18(9):1101-8.  
 [12] Madhavarao C N, Arun P, Moffett J R, et al. Defective N-acetylaspartate catabolism reduces brain acetate levels and myelin lipid synthesis in Canavan's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(14):5221-6.  
 [13] 陈韵彬, 刘征华, 鲍道亮, 等. 氢质子磁共振波谱诊断鼻咽癌早期放射性脑损伤 [J]. *福建医科大学学报*, 2007, 41(3):222-6.  
 [14] Otake M, Schull W J. Review: Radiation-related brain damage and growth retardation among the prenatally exposed atomic bomb survivors [J]. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74(2):159-71.

## Effects of irradiation in utero from tritiated water on the distribution of neural cells and brain function in rats

Yao Xiaobo<sup>1</sup>, Wang Yongsheng<sup>1</sup>, Qiu Jun<sup>2</sup>, et al

<sup>1</sup>Institute of Radiation Medicine, School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Magnetic Resonance, The Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To explore the effects of β irradiation in utero from tritiated water on the distribution of neural cells and brain function in rats. **Methods** Pregnant adult Sprague-Dawley rats were irradiated with β rays from tritiated water (HTO, 3.7 × 10<sup>6</sup> Bq/g body fluid) by a single intraperitoneal injection on the 10th day of gestation

(E10). Brain specimens from rat offsprings were collected on the 18th day of gestation (E18) and postnatal day 0 (P0). The expression of neural cell adhesion molecule NCAM and L1 in cerebral cortex was assayed with immunocytochemical staining to study effects of beta radiation from HTO on neuronal migration in offsprings. Morris water maze was used to detect the changes of brain function during P38 ~ P42. The proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H-MRS}$ ) was used to measure the ratio of Cho/Cr (choline/creatinine) and NAA/Cr (N-acetyl aspartate/creatinine) in cerebral cortex on P90 to analyse the distribution of neural cells. **Results** Compared with control, the expression of neural cell adhesion molecule NCAM and L1 in brains of experimental offsprings (E18 and P0) was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The escape latency of experimental offsprings was significantly prolonged ( $P < 0.05$ ). The swimming time in the quadrant of platform was obviously shortened in the probe trial ( $P < 0.05$ ). The ratio of NAA/Cr in experimental group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ) and there was no difference between Cho/Cr ratios in two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that HTO irradiation in utero could induce brain disfunction and disturb the distribution of neuronal cells in offspring. The mechanisms may be related to the downregulation of neural cell adhesion molecule NCAM and L1.

**Key words** tritiated water; ionizing radiation; neuronal migration; Morris water maze; proton magnetic resonance spectroscopy

◇ 学位论文摘要 ◇

## 乳铁蛋白抗菌-乳源免疫调节融合肽的表达纯化 及其基因对 SKOV3 细胞的影响

硕士研究生 张文晓 指导教师 秦宜德

**摘要** 目的 构建并鉴定牛乳铁蛋白抗菌-乳源免疫调节融合肽(简称 LIFP)基因的重组载体,在大肠杆菌 BL21 中诱导表达和纯化,获得较高纯度的融合肽;研究 LIFP 基因体外对卵巢癌细胞 SKOV3 的影响,为基因治疗卵巢癌提供基础。方法 以 GENBANK 报道的牛乳铁蛋白抗菌肽(LFCINB)与乳源免疫调节肽(PGPIPN)的序列为参照,以连接臂 GGGGS 连接两种肽,合成融合肽 LIFP 基因,并在其 5' 端加入凝血酶 FXA 识别的酶切位点。将 LIFP 基因构建到表达载体 PGEX-KG 中,PCR 筛选阳性克隆,测序鉴定后,采用最优表达条件诱导重组载体在大肠杆菌 BL21 中表达,超声裂菌后,SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定融合蛋白(LIFP-GST),通过 AKTA 层析系统纯化融合蛋白,FXA 酶切后,高效液相色谱(HPLC)、质谱(MS)鉴定 LIFP 的表达;将 LIFP 基因构建到 PLJM1 载体[含 CMV 启动子和绿色荧光蛋白(GFP)中],获得 PLJM1-LIFP 慢病毒表达

载体,经 PCR 检测及测序鉴定后,与慢病毒包装质粒通过 LIPOFEETAMINE 2000 共转染至包装细胞 293T,包装产生病毒液,并测定其滴度;体外培养人卵巢癌细胞 SKOV3,重组慢病毒感染细胞后,MTT 法观察融合肽对 SKOV3 细胞的生长抑制作用,HO-ECHST33258 染色观察细胞核形态的变化。结果 PCR 和测序证实成功构建了 PGEX-KG-LIFP 重组载体;WESTERN-BLOT 结果显示成功诱导 LIFP 的高表达;HPLC 显示获得较高纯度 LIFP;MS 显示氨基酸序列与目的肽一致;成功构建 PLJM1-LIFP 慢病毒表达载体,三质粒共转染 293T 细胞后,荧光显微镜下可见大量绿色荧光。包装慢病毒产生病毒悬液的滴度为  $1.2 \times 10^8$  TU/ml;重组慢病毒感染 SKOV3 细胞后,MTT 结果显示融合肽对体外培养的 SKOV3 细胞生长具有抑制作用( $P < 0.05$ ),荧光显微镜观察到凋亡细胞典型的形态学特征。结论 成功诱导表达纯化融合肽,并初步证实对体外 SKOV3 有生长抑制和诱导细胞凋亡作用。

**关键词** 融合肽;表达;纯化;慢病毒载体;细胞凋亡

基金项目:国家自然科学基金(编号:30872992)

作者单位:安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥

230032