

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01171

· 论 著 ·

## 融合蛋白 AnxB1-MLT 的表达、纯化及其对肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 增殖的抑制作用

王玉招, 颜宏利, 唐冠楠, 林恒荣, 章意亮, 孙树汉\*

第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 以膜联蛋白 B1(AnxB1)为导向分子,与蜂毒素(MLT)基因融合,制备 AnxB1-MLT 融合蛋白,探讨其对磷脂酰丝氨酸脂质体的结合活性及对肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 增殖的抑制作用。**方法** 利用重叠延伸 PCR 技术构建 *AnxB1* 和 *MLT* 的融合基因 *AnxB1-MLT*,克隆至原核表达载体 pGEX-5T,转化至宿主菌 K802,用异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 AnxB1-MLT 融合蛋白表达,优化表达条件,用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)亲和色谱纯化柱纯化融合蛋白。采用磷脂结合实验验证 AnxB1-MLT 融合蛋白的钙依赖性磷脂结合活性,采用 CCK-8 方法分别检测 AnxB1-MLT 融合蛋白对肝癌细胞系 SMMC7721 和 HepG2 细胞增殖的影响。**结果** AnxB1-MLT 融合蛋白在宿主菌 K802 中能够表达,在菌液生长至  $D_{600}$  为 0.6 时,加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L,低温(22~24℃)诱导表达 4 h,可使蛋白表达量较高且在上清有表达。通过 GST 亲和色谱纯化柱纯化融合蛋白,SDS-PAGE 结果显示在 63 000 处可见单一目的条带,纯度>95%。AnxB1-MLT 融合蛋白保留了 AnxB1 的钙依赖性磷脂结合活性,并能显著抑制肝癌细胞系 SMMC7721 和 HepG2 的增殖。**结论** 成功制备了 AnxB1-MLT 融合蛋白,该融合蛋白具有 AnxB1 的钙依赖性磷脂结合活性,可抑制肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 的增殖,为进一步利用动物实验研究 AnxB1-MLT 的抗肿瘤效果奠定了基础。

**[关键词]** 膜联蛋白 B1; 蜂毒素; 细胞增殖; 靶向药物治疗**[中图分类号]** R 735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)11-1171-06

### Expression and purification of AnxB1-MLT chimera and its inhibitory effect on SMMC7721 and HepG2 cell proliferation

WANG Yu-zhao, YAN Hong-li, TANG Guan-nan, LIN Heng-rong, ZHANG Yi-liang, SUN Shu-han\*

Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To obtain a chimera composed of annexin B1 (AnxB1) and melittin (MLT) and to investigate its inhibitory effect on phosphatidylserine liposome activity and SMMC7721 and HepG2 cell proliferation. **Methods** A fusion gene *AnxB1-MLT* was constructed by overlap extension gene splicing and then was inserted into plasmid pGEX-5T. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* strain K802 and induced by IPTG at low temperature. The expression condition was optimized and GST affinity chromatography column was used for purification. Calcium-dependent phospholipid binding assay was used to determine whether the chimera kept the activity of AnxB1. CCK8 analysis was employed to investigate the effect of AnxB1-MLT on SMMC7721 and HepG2 cell proliferation. **Results** After being inserted into the expression plasmid, AnxB1-MLT protein expressed in K802 cells, with a high level recombinant protein induced by 0.2 mmol/L IPTG at 22-24℃ for 4 h. The protein AnxB1-MLT was purified by using GST affinity chromatography column (a band at 63 000) and the purification of the final purified protein was >95%. AnxB1-MLT was able to bind to phosphatidylserine liposome in a calcium-dependent manner. CCK8 analysis indicated that AnxB1-MLT inhibited SMMC7721 and HepG2 cell proliferation at a dose-dependent manner. **Conclusion** We have successfully constructed a chimera AnxB1-MLT, which retains the calcium-dependent phospholipid binding activity of AnxB1, and can inhibit the proliferation of hepatic cancer cell lines SMMC7721 and HepG2.

**[收稿日期]** 2013-03-27**[接受日期]** 2013-05-27**[基金项目]** 国家自然科学基金(81272280),上海市浦江人才计划. Supported by National Natural Science Foundation of China(81272280) and Shanghai Pujiang Talent Project.**[作者简介]** 王玉招, 实验师.

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com

[Key words] annexin B1; melittin; cell proliferation; targeted drug therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11): 1171-1176]

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是亚洲尤其是中国高发的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类的的生活和健康。靶向药物治疗日益成为肿瘤治疗的重要手段。磷脂酰丝氨酸是磷脂膜的重要组成部分, 约占细胞总脂质的 2%~10%<sup>[1]</sup>。在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸居于细胞内侧, 参与蛋白激酶 C 信号传递<sup>[2]</sup>、胞质蛋白的膜转移<sup>[3]</sup>等。越来越多的研究证实, 肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞的磷脂酰丝氨酸外翻, 暴露在细胞外膜, 从而为肿瘤显像和靶向治疗提供了重要的目标靶点<sup>[4-7]</sup>。膜联蛋白 B1 (annexin B1, AnxB1) 是本课题组首次克隆的一个新的膜联蛋白亚家族成员<sup>[8]</sup>。我们的前期研究表明, AnxB1 对磷脂酰丝氨酸的结合具有很高的亲和力和特异性<sup>[9]</sup>, 可以在体外和体内检测肿瘤细胞的凋亡和显像<sup>[10-12]</sup>。蜂毒素 (melittin, MLT) 又称蜂毒肽, 是蜂毒的主要成分, 由 26 个氨基酸残基组成, 具有潜在膜活性, 其寡聚体可在细胞膜上形成亲水性小孔, 使胞内离子外流, 引起渗透性改变, 导致细胞溶解, 对细胞有极强的杀伤作用<sup>[13]</sup>。本研究拟以肿瘤内皮细胞暴露的磷脂酰丝氨酸为“靶”, 以 AnxB1 为“靶向分子”, 以蜂毒素为“弹药”, 构建基因工程靶向抗肿瘤药物。

### 1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pGEX-5T、含 AnxB1 的质粒 pGEX-5T-AnxB 和大肠杆菌 K802 由本室保存; MLT 基因序列 (Melitt) 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 (GenBank: AFI40556. 1)。肝癌细胞 SMMC7721 和 HepG2 购自中国科学院细胞库。细胞 DMEM 培养基购自 Corning 公司, 血清购自 Gibco 公司; 限制性内切酶 (*Sal* I、*Eco*R I)、*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 亲和色谱纯化柱 (GST-resin) 购自上海悦克生物科技有限公司; 蛋白胶染色液采用上海迪申生物技术有限公司的考马斯亮蓝 G250 染色液; 胶回收试剂盒购自上海皓嘉科技发展有限公司; 蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (PMSF) 购自碧云天生物技术研究所; CCK-8 细胞增殖试剂盒购自日本同仁化学研究所; STE 溶液的配制: 10 mmol/L Tris-HCl、

150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 高压灭菌, 4℃ 保存。超声破碎仪 Q700 购自美国 Qsonica 公司。

1.2 质粒 pGEX-AnxB1-MLT 的构建 因为 AnxB1 的 C 端是一个柔性末端, 考虑 AnxB1 和 MLT 融合不需要人为添加“接头”序列, 因此我们采用重叠区延伸法构建了 AnxB1 和 MLT 的融合基因, 构建过程参照文献<sup>[14]</sup>进行 (图 1)。所用引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物 a: 5'-GCG GAA TTC CAT GGC CTA CTG TCG CTC CCT-3'; 引物 b: 5'-TTG AAA CTC ATC GGC CCT GCA-3'; 引物 c: 5'-CTT TGA GTA GCC GGG ACG T-3'; 引物 d: 5'-GGC GTC GAC TTA CTG TTG CCT CTT ACG TTT AA-3'。利用引物 a 和 b 扩增 AnxB1 基因, 引物 c 和 d 扩增 MLT 基因。其中引物 b 和 c 的部分序列互补, 这样将两轮扩增的产物纯化后进行退火, 可以利用引物 b 和 c 的重叠区部分进行退火、延伸, 最后获得 AnxB1-MLT 融合基因。获得目的基因后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收目的 DNA。回收产物经 *Sal* I / *Eco*R I 双酶切, 与同样用 *Sal* I / *Eco*R I 双酶切的 pGEX-5T 载体用 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶于 16℃ 连接, 过夜, 将连接产物转化到感受态大肠杆菌 K802, 得到重组大肠杆菌 K802 (pGEX-AnxB1-MLT)。挑取单菌落, 接种于含氨苄西林 100 μg/mL 的 LB 培养液, 小量提取质粒 pGEX-AnxB1-MLT, 双酶切鉴定后送上海赛音生物技术公司进行测序。

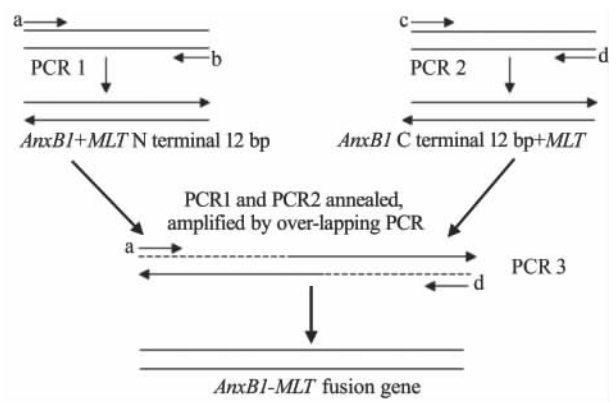


图 1 重叠区延伸法构建 AnxB1-MLT 融合基因示意图  
Fig 1 Construction of AnxB1-MLT fusion gene by over-lap extension method

1.3 诱导表达条件的优化 挑取重组大肠杆菌 K802(pGEX-AnxB1-MLT) 单克隆于 4 mL LB 培养液(含氨苄西林 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )中培养过夜,按照 1:30 的比例转接到 25 支含 3 mL 培养液的培养管中 37 $^{\circ}\text{C}$  培养。分别就诱导时菌液的浓度、诱导剂异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的量、诱导时间、诱导温度等条件进行优化,根据 SDS-PAGE 和染色结果,选择表达量最大的诱导条件作为最优条件。

1.4 融合蛋白的分离纯化 将诱导表达后的培养物离心,收集菌体,按每 250 mL 培养物加入 STE 溶液 12 mL 的比例重悬菌体。为了便于超声,将重悬菌液分装入 8 个 1.5 mL Eppendorf 管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$  离心 3 min,弃上清,用预冷的 STE 溶液重悬(每管 1 mL),加入 PMSF(100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,每管 10  $\mu\text{L}$ ),进行超声破碎。超声条件如下:输出功率 50% 超声 10 s 停 30 s。超声 25 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$  离心 10 min,分别取上清及沉淀加入样品缓冲液制备电泳样品,进行 SDS-PAGE。

将超声上清按体积比 1:100 的比例加入 PMSF,上样于预先用 10 倍柱体积的 STE 溶液平衡好的 GST-resin 纯化柱,样品上样完成后,用 10 倍柱体积的 STE 溶液洗柱,用 5 mL 洗脱缓冲液(0.01 g 还原型谷胱甘肽加入 5 mL STE 溶液)将样品从纯化柱上洗脱,收集洗脱液,获得纯化后的 AnxB1-MLT 融合蛋白。以 Bradford 法测定蛋白浓度(试剂盒购自碧云天生物技术研究所)。

1.5 钙磷脂结合实验 利用薄膜分散法制备脂质体,分别将 0.1 g 磷脂酰丝氨酸(Sigma)或磷脂酰胆碱(Sigma)和 0.01 g 胆固醇(Sigma)置于 20 mL 梨形瓶中,加入 2 mL 乙醚使其溶解,一边摇动一边用氮气吹干乙醚,在梨形瓶的壁上形成一层脂质薄膜,加入 1 mL 含  $\text{CaCl}_2$  的生理盐水,不断摇动,充分水化脂质薄膜;水浴超声 5 min 后,即获得磷脂酰丝氨酸或磷脂酰胆碱为主的脂质体。在  $\text{Ca}^{2+}$  和 EGTA 存在的条件下,分别将磷脂酰丝氨酸或磷脂酰胆碱脂质体和大肠杆菌表达的 AnxB1-MLT 融合蛋白温育 30 min,以低温超速(16 000 $\times g$ )离心 20 min 后分别收集上清和沉淀。10% SDS-PAGE 分离,考马斯亮蓝染色,观察结果。

1.6 CCK-8 试剂盒检测融合蛋白对肝癌细胞增殖的影响 实验分为 3 组:实验组(含有细胞的培养液、AnxB1-MLT 融合蛋白、CCK-8),对照组(含有细胞的培养液、CCK-8),空白组(不含有细胞的培养

液、CCK-8)。将培养的肝癌细胞系 SMMC7721 或 HepG2 按每孔  $2 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔培养板,每组设置 3 个复孔,加 100  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,实验组加入 4、8、16、32 mg/L 融合蛋白,分别在 0、24、48、72 h 加入 CCK-8 溶液(5 mg/mL)10  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中继续培养 1.5 h。用全自动酶标仪测定每孔的光密度(D)值,测定波长为 450 nm。以时间为横轴,D 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.7 统计学处理 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 18.0 软件包对实验数据进行分析,两组间比较采用 Student *t* 检验(和对照组比较),检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 AnxB1-MLT 融合基因的鉴定 将重组质粒 pGEX-AnxB1-MLT 扩增培养后,利用 *Sal* I/*Eco*R I 双酶切鉴定,结果在 1 100 bp 和 5 000 bp 的位置各出现一条带(图 2),分别与融合基因 AnxB1-MLT(1.1 kb)和 pGEX 载体(5.2 kb)的实际大小相符。对酶切鉴定正确的质粒委托上海赛音生物技术公司进行测序,没有发现突变。

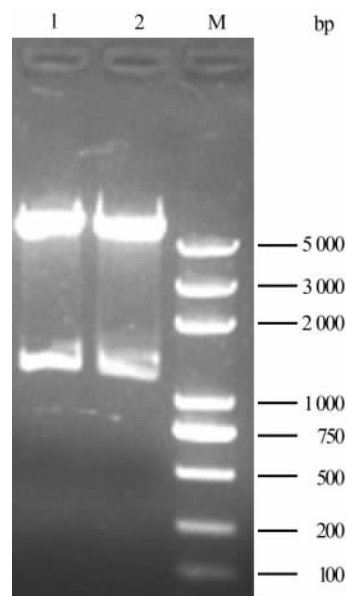


图 2 重组质粒 pGEX-AnxB1-MLT 的双酶切鉴定

Fig 2 Identification of the recombinant plasmid pGEX-AnxB1-MLT by restriction enzyme digestion

1, 2: pGEX-AnxB1-MLT digestion with *Sal* I/*Eco*R I; M: DNA marker

2.2 诱导表达条件的优化 以浓度为 0.6 mmol/L

的 IPTG 在菌液的  $D_{600}$  分别为 0.4、0.5、0.7、0.9、1.0、1.2 时进行诱导, 结果发现菌液的  $D_{600}$  为 0.7 时诱导表达量最大。在菌液  $D_{600}$  为 0.7 时, 分别加入 IPTG 至终浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L, 结果发现 IPTG 在 0.6 mmol/L 时达到最大表达量。当菌液的  $D$  值和 IPTG 浓度均在最优条件时诱导蛋白表达, 超声破菌后上清液中没有蛋白, 表达产

物仅以包涵体形式存在, 重新调整诱导表达条件, 将 IPTG 浓度和诱导时间及诱导温度进行调整, 当菌液的  $D_{600}$  为 0.6 时, 以 0.2 mmol/L 的 IPTG 在 22℃ 诱导 4 h, 收集菌体, 超声破碎, 离心, 分别收集菌体破碎液的上清与沉淀, 电泳结果显示, 上清液和沉淀中均有目的蛋白, 表达产物以可溶性和包涵体两种形式存在, 结果如图 3 所示。

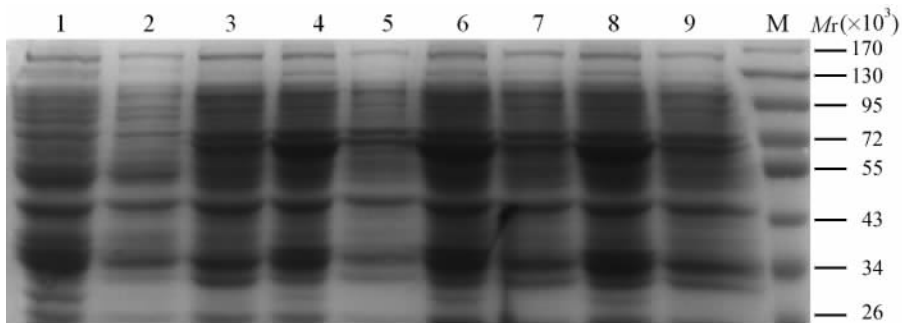


图 3 AnxB1-MLT 融合蛋白表达的电泳分析

Fig 3 Expression and distribution of AnxB1-MLT protein in *E. coli*

1: Total cell lysis before induction; 2: Supernatant before induction; 3,5,7: Total cell lysis after induction; 4,6,8,9: Supernatant after induction; M: Protein marker

2.3 AnxB1-MLT 融合蛋白的纯化 诱导表达产物破碎上清液通过 GST-resin 纯化柱回收目的融合蛋白, SDS-PAGE 结果表明, 在 63 000 处有单一目的条带, 纯度大于 95% (图 4)。

的钙依赖性磷脂结合活性。

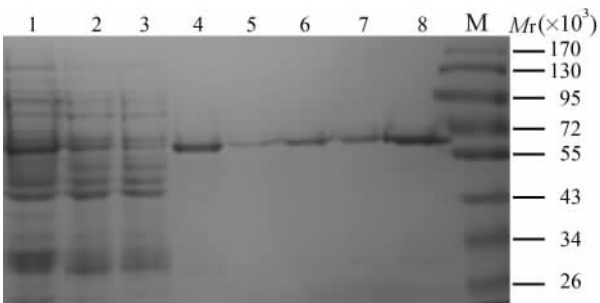


图 4 AnxB1-MLT 融合蛋白纯化电泳图

Fig 4 Purification of AnxB1-MLT

1: Pellet after sonication; 2: Supernatant after sonication; 3: Collected samples after purified column; 4-8: Purified protein; M: Protein marker

2.4 AnxB1-MLT 融合蛋白的磷脂结合活性 利用薄膜分散法制备磷脂酰丝氨酸和磷脂酰胆碱脂质体, 分别在 200 mmol/L  $Ca^{2+}$  溶液中与 AnxB1-MLT 共孵育后超速离心, 结果 AnxB1-MLT 与磷脂酰丝氨酸脂质体共孵育后仅在沉淀中检测到; 而与磷脂酰胆碱脂质体共孵育后仅能在上清中检测得到 (图 5), 说明 AnxB1-MLT 融合蛋白保留了 AnxB1

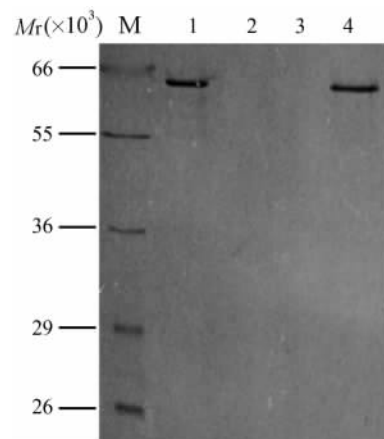


图 5 AnxB1-MLT 融合蛋白钙磷脂结合实验

Fig 5 Calcium-phospholipid binding assay of AnxB1-MLT

M: Marker; 1: Pellet after inoculated with phosphatidylserine (PS) lipids; 2: Supernatant after inoculated with PS lipids; 3: Pellet after inoculated with phosphatidylcholine (PC) lipids; 4: Supernatant after inoculated with PC lipids

2.5 AnxB1-MLT 融合蛋白对肝癌细胞系 SMMC7721、HepG2 增殖的影响 CCK-8 结果 (图 6) 显示, 融合蛋白 AnxB1-MLT 能显著抑制 SMMC7721 和 HepG2 细胞的增殖, 且随着融合蛋白浓度的增加, 抑制效率显著增加, 具有明显的剂量依赖效应。

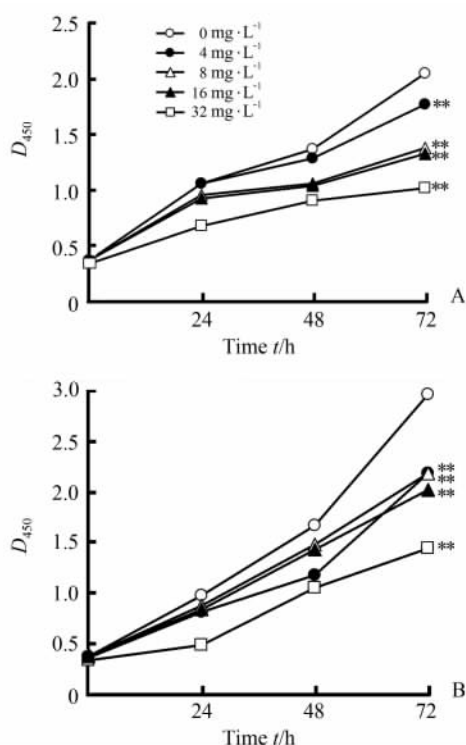


图 6 AnxB1-MLT 融合蛋白抑制 SMMC7721(A) 和 HepG2(B) 肝癌细胞的增殖 (CCK-8 检测结果)

Fig 6 AnxB1-MLT inhibited proliferation of SMMC7721(A) and HepG2(B) cells (CCK-8 assay)

\*\*  $P < 0.01$  vs control (0 mg/L)

### 3 讨论

MLT 的抗肿瘤作用在基础研究和临床实践中已得到越来越多的证实。凌昌全等<sup>[15-17]</sup>研究发现, MLT 重组腺病毒对肝癌细胞具有抑制作用, 其体外转染降低肝癌细胞致瘤能力, 肿瘤内注射对肝癌裸鼠也有抑癌效果。MLT 的体外抑瘤作用明显, 而且作用发生迅速。但是, MLT 的药理作用很复杂, 除具有抗肿瘤作用外, 对人体各大系统都有影响, 具有较强的毒副作用: 如溶血、呼吸中枢麻痹、心律失常等, 大大限制了其在临床上的应用<sup>[18]</sup>。

我们的前期研究表明, AnxB1 对磷脂酰丝氨酸具有较高的亲和力和特异性<sup>[9]</sup>, 是一个较为理想的靶向分子, 因此本研究将 AnxB1 和 MLT 融合, 旨在获得一个靶向抗肿瘤融合蛋白。构建融合蛋白首先要考虑的是融合基因的拼接问题, 如 MLT 在 AnxB1 的 N 端还是 C 端, 是否需要柔性的接头等。考虑到 MLT 相对分子质量较小, 而在 AnxB1 C 端的 22 个氨基酸构成一个柔性的末端<sup>[8]</sup>, 因此本研究选择将 MLT 放在 AnxB1 的 C 端。另外, 利用计算

机辅助药物设计软件对加和不加柔性接头进行比较, 发现直接将 MLT 加在 AnxB1 上稳定性更好, 因此我们利用重叠延伸法将 MLT 直接加在了 AnxB1 的 C 端。

原核蛋白表达真核基因的融合蛋白, 另一个比较重要的问题是融合蛋白是包涵体表达还是可溶性表达。包涵体表达的蛋白虽然表达量往往比较高, 但需要进行变性处理, 纯化工艺复杂, 而且复性率常常较低。我们最初将 AnxB1-MLT 装在 pET28a 表达载体中进行诱导表达, 虽然进行了诱导条件优化, 表达蛋白仍然全部以包涵体表达。pGEX5T 是常用的 GST 融合基因表达载体, 表达产物常以可溶性蛋白存在。后将 AnxB1-MLT 克隆至 pGEX5T 表达载体, 利用 IPTG 诱导表达, 发现 37℃ 时诱导表达产物多数仍然为包涵体表达。进一步优化条件, 在 22~24℃ 时诱导表达, 产物大部分以可溶性蛋白表达。表达产物利用 GST 亲和层析柱进行纯化, 一步纯化后蛋白纯度大于 95%, 纯化工艺较为简便。

本研究进一步验证了 AnxB1-MLT 融合蛋白中 AnxB1 的钙依赖性磷脂结合活性和 MLT 的杀伤活性。磷脂结合实验表明, 纯化的融合蛋白 AnxB1-MLT 较好地保留了钙依赖性磷脂结合活性; CCK8 实验表明, 融合蛋白对 SMMC7721 和 HepG2 的增殖具有抑制作用。由于 CCK8 结果反映的是活细胞数量, 因此 AnxB1-MLT 抑制肝癌细胞增殖可能有以下两种可能: 一是融合蛋白与肝癌细胞结合后, 延缓了肝癌细胞的细胞周期, 从而影响了细胞增殖; 另一种可能是, 融合蛋白具有和 MLT 类似的细胞杀伤活性, 促进了细胞的死亡或凋亡。关于 AnxB1-MLT 抑制肝癌细胞增殖的机制还需进一步研究。总之, 磷脂结合实验和 CCK8 实验证明, 融合蛋白 AnxB1-MLT 较好地保留了 AnxB1 和 MLT 各自的生物学活性, 为进一步利用荷瘤小鼠评价 AnxB1-MLT 的体内抗肿瘤作用奠定了基础。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Huang C, Jin H, Qian Y, Qi S, Luo H, Luo Q, et al. Hybrid melittin cytolytic peptide-driven ultrasmall lipid

- nanoparticles block melanoma growth *in vivo* [J]. ACS Nano, 2013, 7: 5791-5800.
- [2] Vance J E, Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine [J]. Prog Lipid Res, 2005, 44: 207-234.
- [3] Stace C L, Ktistakis N T. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1761: 913-926.
- [4] Yeung T, Gilbert G E, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization [J]. Science, 2008, 319: 210-213.
- [5] Jennewein M, Lewis M A, Zhao D, Tsyganov E, Slavine N, He J, et al. Vascular imaging of solid tumors in rats with a radioactive arsenic-labeled antibody that binds exposed phosphatidylserine [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14: 1377-1385.
- [6] Schutters K, Reutelingsperger C. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases [J]. Apoptosis, 2010, 15: 1072-1082.
- [7] Kenis H, Reutelingsperger C. Targeting phosphatidylserine in anti-cancer therapy [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15: 2719-2723.
- [8] Hongli Y, Shuhan S, Ruiwen C, Yingjun G. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 119: 1-5.
- [9] 王芳, 张毅, 颜宏利, 高远舰, 刘凡, 贺艳, 等. Annexin B1与磷脂酰丝氨酸的结合活性 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25: 44-46.  
Wang F, Zhang Y, Yan H L, Gao Y J, Liu F, He Y, et al. Binding activity of annexin B1 to externalized phosphatidylserine [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25: 44-46.
- [10] 罗全勇, 陈泽泉, 陈立波, 王芳, 袁志斌, 孙树汉, 等.  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -Annexin B1探测荷瘤鼠化疗后肿瘤细胞凋亡的实验观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15: 1524-1527, 1539.
- [11] 罗全勇, 王芳, 张志勇, 刘兴峰, 罗琼, 张毅, 等.  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -联脒尼克酰胺-膜联蛋白 B1 的制备及其探测细胞凋亡的生物学评价 [J]. 中国核医学杂志, 2008, 28: 217-222.
- [12] 罗全勇, 张志勇, 王芳, 张毅, 陆汉魁, 孙树汉, 等.  $^{99}\text{Tc}$ -Annexin B1 的制备及其探测细胞凋亡的实验研究 [J]. 中国医学影像技术, 2008, 24: 1177-1181.
- [13] Lazarev V N, Parfenova T M, Gularyan S K, Misyurina O Y, Akopian T A, Govorun V M. Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in an HeLa cell line [J]. Int J Antimicrob Agents, 2002, 19: 133-137.
- [14] 颜宏利, 孙树汉, 陈蕊雯, 杨湘越. 膜联蛋白 32 与低分子量单链尿激酶融合基因的构建及高效表达 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23: 378-380.  
Yan H L, Sun S H, Chen R W, Yang X Y. Construction and expression of low relative molecular mass single-chain urokinase-type plasminogen activator (ScuPA32k) and annexin 32 [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2002, 23: 378-380.
- [15] 凌昌全, 李柏, 张晨, 顾伟, 李绍祥, 黄雪强, 等. 蜂毒素基因重组腺病毒抗肝癌作用的实验研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12: 741-745.
- [16] 凌昌全, 黄雪强, 刘岭. 蜂毒素体外抑瘤作用的实验研究 [J]. 第二军医大学学报, 2001, 22: 612-614.  
Ling C Q, Huang X Q, Liu L. The anti-tumor effect of melittin *in vitro* [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2001, 22: 612-614.
- [17] 刘岭, 凌昌全, 黄雪强. 蜂毒素的纯化方法及体外抗肿瘤作用研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24: 163-166.
- [18] Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 36: 697-705.

[本文编辑] 孙岩