

· 论 著 ·

人  $\beta$  淀粉样蛋白 1-42 在大肠杆菌中的表达纯化及鉴定\*熊坤林<sup>1</sup>, 杨清武<sup>2</sup>, 熊任平<sup>3</sup>

(第三军医大学大坪医院: 1. 放射科; 2. 神经内科; 3. 野战外科研究所第六研究室, 重庆 400042)

**摘要:**目的 在大肠杆菌中表达人源性  $\beta$  淀粉样蛋白 1-42(A $\beta$ 1-42), 纯化表达蛋白并进行 Western blot 鉴定。方法 根据 Gen Bank 中人源性 A $\beta$ 1-42 编码序列, 分为 3 个片段人工合成, 经退火延伸为全长 dsDNA 序列, 酶切后连接至表达质粒 pET-28a(+), 构建为重组质粒 pET-28a-A $\beta$ 1-42, 转化至大肠杆菌 BL21 株中, 筛选高表达株, 诱导表达, 利用 Ni<sup>+</sup> 亲和和纯化表达蛋白, SDS-PAGE 后, 转印 PVDF 膜, 进行 Western blot 鉴定。**结果** 获得纯化的大肠杆菌表达蛋白 A $\beta$ 1-42, 表达形式为包涵体, 经 Western blot 鉴定为人源性 A $\beta$ 1-42 蛋白。**结论** 本研究获得了纯化的 A $\beta$ 1-42 蛋白, 为下一步采用 A $\beta$ 1-42 标记该蛋白作为诊断分子奠定了基础。

**关键词:**  $\beta$  淀粉样蛋白 1-42; 阿尔茨海默病; 蛋白表达**中图分类号:** R749.16; R446.61**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)03-0262-03Expression of human  $\beta$  amyloid 1-42 protein in E. coli and its purification and identification\*XIONG Kun-lin<sup>1</sup>, YANG Qing-wu<sup>2</sup>, XIONG Ren-ping<sup>3</sup>

(1. Department of Radiology; 2. Department of Neurology; 3. Sixth Department of Surgery

Research Institute, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To express the human  $\beta$  amyloid 1-42 protein in E. coli, purify the protein and identify it by Western blot. **Methods** The gene fragment coding the human  $\beta$  amyloid 1-42 region was synthesized with 3 fragments and annealed, then digested by restrictive enzyme and linked into the expression plasmid pET-28a(+) to construct the expression plasmid pET-28a-A $\beta$ 1-42. After identified by restrictive enzyme and DNA sequencing, the expression plasmid was transformed into E. coli BL21 strain, the high expression strain was selected and induced, the expressed recombinant protein was purified by using Ni<sup>+</sup> affinity chromatograph, and the purified protein was transferred to PVDF membrane after SDS-PAGE, and then identified by Western blot. **Results** The expressed recombinant protein was purified, it was expressed as inclusion body form, and the expressed protein was identified to be human  $\beta$  amyloid 1-42 protein by Western blot. **Conclusion** The human  $\beta$  amyloid 1-42 protein is expressed and purified, and this work provides a basis and material for A $\beta$ 1-42 protein marked and used as molecular diagnosis tool for Alzheimer's disease.

**Key words:**  $\beta$  amyloid 1-42; Alzheimer's disease; protein expression

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是发生于老年和老年前期的中枢神经系统变性疾病, 临床上表现为隐袭起病、进行性发展的记忆减退、认知、语言障碍及人格改变等。其特征性病理学改变是大脑皮层和皮层下结构细胞内神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)、细胞外大量老年斑(senile plaque, SP)形成及神经元缺失等<sup>[1-3]</sup>。其已成为继心脏病、癌症和中风之后第 4 位死因。神经毒性  $\beta$  淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )在脑内的聚集和异常沉积是 AD 发病的关键环节。AD 医学影像学诊断尚无突破性进展, 为研制一种敏感且具有高血脑屏障的分子特异性探针——腐胺-钆- $\beta$  淀粉样蛋白(putrescine-Gadolinium- amyloid- $\beta$  peptide, PUT-GD-A $\beta$ ), 该分子探针既可特异性标记 AD 的  $\beta$  淀粉样斑块( $\beta$ -amyloid plaques), 也因为金属钆而产生 MRI 下可见的对比增强, 可用于 AD 的影像诊断和鉴别诊断<sup>[4]</sup>。本研究拟在大肠杆菌中高效表达并纯化人源性  $\beta$  淀粉样蛋白 1-42(A $\beta$ 1-42), 为该标记探针的制备提供物质基础。

**1 材料与方**

**1.1 质粒、菌株** 表达质粒 pET-28a(+), 购自美国 Novagen 公司, 大肠埃希菌 BL21(DE3)株由本室保存。

**1.2 主要试剂及引物合成、测序** 高保真 KOD-plus Taq 酶、

限制性内切酶 Nco I、Bam H I、Mag Extractor-His-tag Fusion Protein Purification Kit 试剂盒购自日本 Toyobo 公司, T4 DNA 连接酶购自上海生物工程公司, DNA Marker 及蛋白 Marker 购自北京鼎国生物公司, PVDF 膜购自美国 Roche 公司, A $\beta$ 1-42 蛋白单克隆抗体 6E10(针对 A $\beta$ 1-17)购自美国 Calbiochem 公司, 荧光标记羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥公司, DNA 片段和引物合成及 DNA 测序由上海生工提供服务。

**1.3 人源性 A $\beta$ 1-42 蛋白编码区 DNA 片段的获取** A $\beta$ 1-42 蛋白为酶降解的  $\beta$  淀粉样前体蛋白(homo sapiens amyloid precursor protein, APP)的 616-657 位氨基酸序列。根据该段蛋白的编码区序列(Gen Bank 中的登录号为 NM\_001136130)设计 3 条 DNA 片段, 经退火延伸后形成 A $\beta$ 1-42 蛋白的编码双链 DNA 序列。片段 1: 5'-gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa tt-3'(正链), 片段 2: 5'-cct ttg ttg gaa ccc aca tct tct gca aag aac acc aat ttt tga tga tga act-3'(负链), 片段 3: 5'-cgc tat gac aac acc gcc cac cat gag tcc aat gat tgc acc ttt gtt tga acc cac-3'(负链), 3 条 DNA 片段的退火反应体系为片段 1、2、3(10mmol/L TE 溶解, 终浓度为 10 $\mu$ mol/L) 各 8 $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 2.0 $\mu$ L, dNTPs 2.0 $\mu$ L, KOD-plus Taq 酶 1.0 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.5 $\mu$ L。热循环参数为 94 $^{\circ}$ C、2min;

\* 基金项目: 第三军医大学校管课题资助项目。

(94℃、20s,55℃、20s,72℃、30s)×20 循环;72℃、3min。所获产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段,稀释后用作下一步 PCR 模板,扩增获得目的片段。扩增引物为上游引物:5'-tat acc **atg** gat gca gaa ttc cga cat ga-3'(下划线部分为 Nco I 位点,加黑部分为起始密码),下游引物:5'-ttc **gga tcc tta** cgc tat gac aac acc gcc-3'(下划线部分为 Bam HI 位点,加黑部分为终止密码)。PCR 反应体系(25.0μL)为退火的模板 DNA 回收物(1:100 稀释)1.0μL,10×PCR Buffer 2.5μL,MgCl<sub>2</sub> 2.0μL,dNTPs 2.0μL,KOD-plus Taq 酶 0.2μL,上游引物(10μM)1.0μL,下游引物(10μM)1.0μL,ddH<sub>2</sub>O 15.3μL。热循环参数为 94℃、2min;(94℃、20s,55℃、20s,72℃、30s)×32 循环;72℃、3min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,回收目的片段,作下一步的酶切和连接反应。

1.4 重组质粒 pET-28a- Aβ1-42 的构建

1.4.1 Nco I/Bam HI 双酶切反应 将上一步骤中所回收纯化 Aβ1-42 的 PCR 产物和 pET-28a(+)质粒作 Nco I/Bam HI 双酶切反应,反应体系见表 1。置 37℃、3h 反应。酶切产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,回收目的片段,作下一步的连接反应。

表 1 Nco I/Bam HI 双酶切反应体系(μL)

项目	pET-28a(+)	Aβ1-42PCR 产物
DNA(约 1μg/μL)	20.0	20.0
10×K Buffer	5.0	5.0
BSA	2.0	2.0
Nco I (8u/μL)	2.0	2.0
Bam HI (10u/μL)	2.0	2.0
ddH <sub>2</sub> O	19.0	19.0
总体系	50.0	50.0

1.4.2 连接反应 反应体系为 pET-28a(+)/Nco I、Bam HI 双酶切产物(约 1μg/μL)3.0μL,Aβ1-42/ Nco I、Bam HI 双酶切产物(约 1μg/μL)2.0μL,Ligation high 反应液 5.0μL,总体系 10.0μL。置 16℃、1h 反应。连接产物直接转化大肠埃希菌 BL21 感受态。

1.5 Aβ1-42 蛋白在大肠杆菌中的表达 用常规 CaCl<sub>2</sub> 法制备 BL21 感受态。取 10μL 上一步骤的连接产物常规转化到 100μL BL21 感受态细胞中,将转化产物与 IPTG 和 X-gal 涂布于 LB(Kanr)平板上,37℃ 过夜孵育。挑选阳性克隆,提取重组质粒。阳性重组质粒 pET-28a(+)-Aβ1-42 作 Nco I/Bam HI 双酶切鉴定后,再作 DNA 测序鉴定。挑选重组质粒序列完全正确的阳性重组菌,于 Kanr 的 LB 液体中,37℃、160rpm 离心,培养至菌液 OD600 达 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6h,培养物离心,沉淀用 SDS-PAGE 上样缓冲液裂解,作 15% Tricine-SDS-PAGE 电泳,凝胶扫描成像。对照菌为不含插入基因的质粒 pET-28a(+)转化 BL21 菌。

1.6 重组蛋白表达形式的鉴定 收集诱导表达后菌体,PBS 混悬,超声破菌,15 000g 离心 10min,分别收集上清液和沉淀。裂菌液上清液及沉淀溶解液取样进行 SDS-PAGE 电泳分析。

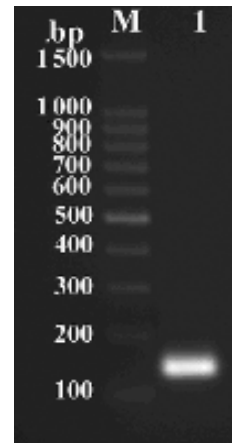
1.7 重组表达蛋白的纯化 表达蛋白的 C-端含 6×His 标签,故采用日本 Toyobo 生物公司的 MagExtractor-His-tag Fu-

sion Protein Purification Kit 试剂盒进行纯化。参照试剂盒说明书中可溶性蛋白和包涵体不溶性蛋白的纯化方法分别进行。所获产物作 15% Tricine-SDS-PAGE 电泳。

1.8 表达蛋白的 Western blot 鉴定 纯化蛋白作 SDS-PAGE 电泳后,转印 PVDF 膜,按照参考文献[5]的方法进行。一抗和二抗的结合和反应参照试剂说明书进行。

2 结 果

2.1 Aβ1-42 蛋白编码片段的获得 通过 3 个合成单链 DNA 片段的退火,获得 126bp 的 Aβ1-42 蛋白编码序列,进一步经 PCR 扩增,获得两端分别含 Nco I、Bam HI 酶切位点的 DNA 片段,同时加入起始密码和终止密码,琼脂糖凝胶电泳见图 1。



M: 1kb DNA marker;1: PCR 产物。

图 1 Aβ1-42 蛋白编码片段 PCR 产物电泳图



M: DNA marker;1: pET28 a(+)-质粒/Nco I、Bam HI 双酶切;箭头标明处为所切出的目的条带。

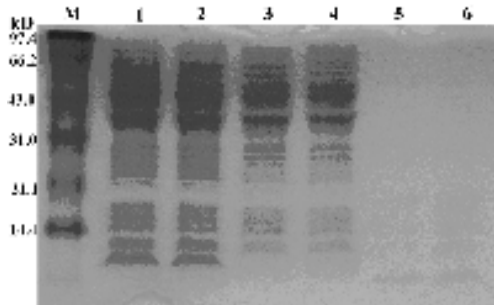
图 2 重组质粒 pET28a(+)-Aβ1-42 经 Nco I/Bam HI 双酶切后电泳图

2.2 pET28 a(+)-Aβ1-42 重组质粒双酶切及核苷酸测序鉴定 将 Aβ1-42 蛋白编码序列片段 PCR 产物作 Nco I/Bam HI 双酶切后回收纯化,与经同样双酶切的 pET28a(+)质粒回收产物连接,连接产物转化 BL21(DE3)细菌感受态细胞,挑取转化平板上的单个菌落,提取重组质粒 pET28a(+)-Aβ1-42,采用 Nco I/Bam HI 双酶切鉴定,酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,见图 2。重组质粒中可切出预期大小的片段(Aβ1-42 蛋白编码序列理论值约为 130bp)。进一步对重组质粒进行 DNA 测序,结果表明,重组质粒的序列和阅读框均完全正确。

测序结果见插页 I 彩图 3。

### 2.3 pET28(a)-A $\beta$ 1-42 表达形式的判定及表达蛋白的纯化

将筛选到的阳性 pET28(a)-A $\beta$ 1-42 工程菌加入 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白表达情况。可见明显的约  $4.5 \times 10^3$  表达蛋白条带, 与理论预期值相符。进一步采用 MagExtractor-His-tag Fusion Protein Purification Kit 进行纯化后得到高纯度目的蛋白, 经凝胶电泳后扫描, 其纯度为 55%, 为进一步的 GST 纯化和 Thrombin 切出成熟的 A $\beta$ 1-42 表达蛋白提供了基础, 见图 3。



M: 蛋白 Marker; 1, 2: pET28a(+)-A $\beta$ 1-42/BL21 工程菌经 IPTG 诱导后菌体; 3, 4: pET28a(+)/BL21 工程菌经 IPTG 诱导后菌体; 5, 6: 纯化重组蛋白 A $\beta$ 1-42(约 6kd)。

图 3 exCAR 表达蛋白的纯化结果

2.5 纯化表达蛋白的 Western blot 鉴定 纯化表达蛋白的 Western blot 结果见图 4。在约  $6 \times 10^3$  位置出现明显特异性阳性条带, 说明表达蛋白确为人源性 A $\beta$ 1-42 蛋白。

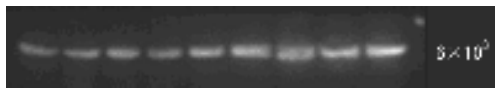


图 4 纯化表达蛋白的 Western blot 鉴定

## 3 讨论

AD 是引起痴呆最常见的疾病之一, 大概占痴呆病因的 50%~60%, 在西方发达国家 AD 在 60~64 岁年龄组的发病率不到 1%, 但在 85 岁及其以上的人群中发病率呈指数级增长(24%~33%); 在发展中国家 AD 的发病率有所降低, 但却有 60% AD 患者是分布在发展中国家的, 目前 AD 成为威胁公众健康的主要疾病, 2001 年全世界 AD 患者 2 400 万, 随着人类寿命的延长, 到 2040 年估计将有 8 100 万 AD 患者<sup>[1-2]</sup>。其已成为继心脏病、癌症和中风之后第 4 位死因。

AD 的诊断除常规行为学检查外, 辅助诊断方法有神经心理学检查、生化指标检查、电生理学检查、神经影像学检查等, 而其中神经影像学检查对病情和病程的判断和预后最为直接和重要<sup>[6]</sup>。由于诊断和鉴别诊断困难, 医学影像学的 AD 研究很受限制, 目前临床上对于 AD 的影像学诊断多停留在脑容量测量(估计脑萎缩程度)或通过 MR 频谱分析成像(MRS)对物质新陈代谢率及葡萄糖代谢等间接检测水平上<sup>[7-8]</sup>。近年来随着分子影像学的发展及 MR 仪器分辨率的不断提高, 特别是 MR 显微成像技术的发展, 为 AD 的明确诊断及病变过程的追踪及定量监测、治疗效果的评判开辟了一条崭新的道路。

本研究拟研制一种敏感的特异性探针(PUT-GD-A $\beta$ ), 其可以特异性标记 AD 的  $\beta$  淀粉样斑块并因为其与金属钆的连接而产生 MRI 下可见的对比增强, 其研究进展将对未来 AD 的诊断及治疗产生直接深刻的影响<sup>[4]</sup>。首先, 该标记法

可用于 AD 疾病的早期发现和明确诊断; 其次, 可用于对疾病的发展过程进行追踪, 并且对于常用的抑制 A $\beta$  生成或减少淀粉负担的治疗措施的疗效进行定量监测评价。这种方法可以解决以往疗效评估无明确定量指标、疗效观察所需时间长(往往需要几个月)等难题。

A $\beta$  是一系列含 39~43 个氨基酸的肽, 为 APP 的水解产物。APP 在  $\beta$  分泌酶作用下生成 APP-C99, 后者在  $\gamma$  分泌酶复合体作用下形成长度不等的 A $\beta$  片段, 包括 A $\beta$ 42、A $\beta$ 43 和 A $\beta$ 40<sup>[9]</sup>。人 A $\beta$ 1-42 蛋白为酶降解的 APP 的 616~657 位氨基酸序列, 其全部氨基酸序列为 DAEFRHDSGYEVH-HQKLIVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA。理论相对分子质量约为  $4.5 \times 10^3$ , 人源性  $\beta$  淀粉样 A4 前体蛋白序列在 GenBank 中的登录号为 NM\_001136130。通常在研究工作中, 往往采用多肽合成的方法获得 A $\beta$ 1-42 肽, 但这种方法仍存在一些问題, 如价格昂贵、难以保存为 A $\beta$ 1-42 单体形式、A $\beta$ 1-42 在多肽合成仪上属于难合成肽等。因此, 本研究采用大肠杆菌表达, 通过 3 条 DNA 片段合成获得 A $\beta$ 1-42 蛋白编码区片段, 连接至表达质粒 pET28a(+), 在大肠杆菌 BL21 株中获得了表达, 并通过纯化蛋白的 Western blot 进一步鉴定了该表达蛋白, 但该蛋白的表达形式为包涵体。

通常来说, 绝大多数外源性蛋白在大肠杆菌中会形成包涵体, 其形成的原因还不甚明了, 但是普遍认为是由于重组蛋白在宿主菌中表达时, 缺乏某些蛋白质折叠过程中所需要的酶或分子伴侣等, 所以无法形成正确的次级键等原因造成的。当外源蛋白表达量过高、重组蛋白含硫氨酸过高、重组蛋白的等电点与胞内 pH 接近及重组蛋白为异源性蛋白时, 更容易形成包涵体<sup>[10]</sup>。本研究曾采用一些措施, 一是降低诱导剂浓度, 如将 IPTG 终浓度降至 0.1 mmol/L; 二是降低诱导时工程菌的培养温度, 如在 25 $^{\circ}$ C 条件下进行诱导, 以降低工程菌合成外源性蛋白的速度, 以期获得可溶性的表达蛋白, 但均未成功。这可能与表达蛋白的特性有关<sup>[5]</sup>。由于 pET 表达系统的宿主细胞为改造后  $\lambda$  噬菌体 CE6 感染的大肠杆菌 BL21 溶源菌株, 该菌株的基因组中整合有 laco 调控的 T7 RNA 聚合酶基因, 这种严格的双重调控可以确保表达载体中目的基因的严格诱导性表达, 有效避免目的蛋白质对宿主细胞的毒性作用而引起的质粒不稳定性<sup>[11]</sup>。

本研究获得的基因工程化 A $\beta$ 1-42 蛋白, N-端含载体序列编码的 6 $\times$ His 和 GST 标签, 采用镍株法一步纯化, 获得的蛋白分子质量约为  $6 \times 10^3$ , 与理论相对分子质量相符。本研究为下一步采用 GST 标签纯化和 Thrombin 切出  $4.5 \times 10^3$  的 A $\beta$ 1-42 蛋白及 PUT-GD-A $\beta$  的制备提供了物质基础。

### 参考文献:

- [1] 王小林, 王永红. 电刺激小脑顶核在阿尔茨海默病治疗中的可能价值[J]. 重庆医学, 2008, 37(19): 2242.
- [2] 王文霞, 臧卫周, 冯艳, 等. 阿尔茨海默病的影响因素研究[J]. 医药论坛杂志, 2005, 26(17): 42.
- [3] 吴芳, 蔡志友, 晏勇. 阿尔茨海默病糖代谢源性发病机制研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(17): 1999.
- [4] Poduslo JF, Curran GL, Gill JS. Putrescine-modified NGF: Bioactivity, pharmacokinetics, blood-brain/nerve barrier permeability and nervous system biodistribution [J]. J Neurochem, 1998, 71: 1651. (下转第 267 页)

TGF- $\beta$  家族成员可以通过剂量依赖方式,在体内外促进 Treg 转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞,后者被认为是真正起作用的 Treg,从而实现对 Treg 的反馈调节作用<sup>[16-17]</sup>。TGF- $\beta$  也可通过抑制免疫效应细胞的增殖、分化以及抑制细胞因子的产生而发挥作用。由此可知,Treg 在胃癌中通过分泌抑制性因子等,使胃癌细胞从机体抗肿瘤免疫反应体系中逃逸,从而促进胃癌的形成与发展。

#### 参考文献:

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease[J]. *Int Rev Immunol*, 2005, 24(3~4): 211.
- [2] Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer[J]. *Blood*, 2006, 108(3): 804.
- [3] Ohmura Y, Yoshikawa K, Saga S, et al. Combinations of tumor-specific CD8<sup>+</sup> CTLs and anti-CD25 mAb provide improved immunotherapy[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(5): 1265.
- [4] Zaccane P, Burton O, Miller N, et al. Schistosoma mansoni egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(4): 1098.
- [5] Nishikawa H, Kato T, Tawara I, et al. Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in wild-type hosts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(26): 9253.
- [6] 曾冬竹, 余佩武, 雷晓, 等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调控 T 细胞对小鼠胃癌的影响[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2007, 10(4): 368.
- [7] Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell suppressor function[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2): 366.
- [8] Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, et al. Expansion of FOXP3 high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients[J]. *Blood*, 2006, 108(8): 2655.
- [9] Larmonier N, Marron M, Zeng Y, et al. Tumor-derived CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10 [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(1): 48.
- [10] Shevach EM, Dipaolo RA, Andersson J, et al. The lifestyle of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *Immunol Rev*, 2006, 212: 60.
- [11] 杨晓鲲, 郑峻松, 张新, 等. G1TR 抗体介导增强 NK 细胞杀伤活性的实验研究[J]. *重庆医学*, 2006, 35(18): 1649.
- [12] Smyth MJ, Teng MW, Swann J, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer[J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1582.
- [13] Nakamura K, Kitani A, Fuss I, et al. TGF-beta1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice[J]. *J Immunol*, 2004, 172(2): 834.
- [14] Tonkin DR, Haskins K. Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner[J]. *Eur Immunol*, 2009, 39(5): 1313.
- [15] Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, et al. Role of TGF-Beta in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function[J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28(6): 640.
- [16] Huber S, Stahl FR, Schrader J, et al. Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into Foxp3<sup>+</sup> induced regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 182(8): 4633.
- [17] Moo-Young TA, Larson JW, Belt BA, et al. Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer [J]. *J Immunother*, 2009, 32(1): 12.
- (收稿日期: 2009-07-05 修回日期: 2009-08-15)
- (上接第 264 页)
- [5] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 125.
- [6] 侯倩. 阿尔茨海默病的诊治进展[J]. *山东医药*, 2008, 48(23): 111.
- [7] Apostolova LG, Dinov ID, Dutton RA, et al. 3D comparison of hippocampal atrophy in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2006, 129(11): 2867.
- [8] Jack CR, Shiung MM, Weigand SD, et al. Brain atrophy rates predict subsequent clinical conversion in normal elderly and amnesic MCI[J]. *Neurology*, 2005, 65(8): 1227.
- [9] Kaye R, Head E, Thompson J, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis[J]. *Science*, 2003, 300: 486.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 417.
- [11] Li M, He S. Purification and characterization of recombinant human interleukin-29 expressed in Escherichia coli [J]. *J Biotechnol*, 2006, 122: 334.
- (收稿日期: 2009-06-09 修回日期: 2009-09-17)