

用于 FK506 类小分子化合物筛选的 细胞模型的建立*

肖鹤¹⁾** 于鸣¹⁾ 李松²⁾ 沈倍奋¹⁾ 黎燕¹⁾

(¹⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; ²⁾军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 建立 FKBP12/Fas 双聚体可诱导细胞凋亡生物效应的细胞模型, 为 FK506 类小分子化合物的初步筛选提供一个可应用的技术平台。首先利用 RT-PCR 方法钓取人源性 Fas 胞浆区基因, 测序鉴定正确后, 插入到载体 pC4M-FV2E 中, 构建 pC4M-FV2E/Fas 表达质粒。然后将 Myr-FKBP12-Fas 融合基因从 pC4M-FV2E/Fas 质粒克隆进 pEGFP-N1 中。最后将重组质粒 pEGFP-N1/FKBP12-Fas 转染进 HEK293 细胞, 并利用 G418 筛选融合基因 FKBP12-Fas 稳定表达的细胞株。实验结果显示, 阳性化合物 AP20187 作用 4~6 h 后, 稳定转染的靶细胞发生凋亡, 基因组呈现典型的“DNA Ladder”, 而 FKBP12 的天然结合蛋白 FK506 可竞争性地阻断这种阳性药物诱导的细胞凋亡。研究提示: 所构建的细胞模型, 可用于以 FKBP12 为靶标、基于 FK506 空间构型设计合成的 FK506 类小分子化合物的初步筛选。

关键词 融合表达, 细胞模型, 细胞凋亡, 竞争抑制

学科分类号 Q2

FK506 是目前临床首选的免疫抑制剂, 它与 FKBP12 及钙调磷酸酶 (calcineurin, CN) 形成“三元复合物”, 可阻断 CN 所介导的信号转导通路, 抑制 IL-2 的分泌与表达。1994 年, Gold 等发现, FK506 还可诱导神经保护和神经再生功能。后来的一系列研究显示: FK506 的神经营养作用及其免疫抑制作用可以分离, 而且 FKBP 为 FK506 神经再生促生作用的靶蛋白。于是一些研究者以 FKBP 为靶点, 模拟 FK506 的结合口袋设计合成了一类小分子化合物, 使其去除 FK506 的效应结构域而保留其结合结构域, 期望通过这种改构, 获得一类新型的 FK506 类小分子化合物——不具有 FK506 的免疫抑制功能而保留其神经营养功能, 能作为神经再生促进剂用于临床。本实验的目的就是在已获得的 pC4M-FV2E 质粒及钓取的人源性 Fas 胞浆区基因的基础上, 建立 FKBP12/Fas 双聚体可诱导细胞凋亡生物效应的细胞模型, 为这类小分子化合物的初步筛选提供一个基础平台。

1 材料和方法

1.1 主要材料

DH5 α 菌株、PUC18 载体、U937 (人淋巴样至单核细胞型)、HEK293 (人胚肾细胞) 细胞均由本室保存。pC4M-FV2E 质粒 (含有一穿膜序列及 2 个分子的 FKBP12)、FK506、阳性化合物 AP20187 由李松教授提供。PCR 采用 TaKaRa 公司

的高保真酶及 Promega 公司的 Taq 酶。引物合成及测序均由上海博亚公司完成。大提质粒 KIT 购自 Promega 公司。LipofectAMINE 购自 Invitrogen 公司。所使用的限制性内切酶、TRIZOL、MCV 反转录酶均购自 BioLab 公司, 连接酶购自 GIBCOL 公司。Apoptosis KIT 购自 Pharmingen 公司。鼠抗人 CD4 抗体由本室研制。

1.2 稳定表达载体的构建和鉴定

利用 RT-PCR 方法从 U937 细胞中钓取 Fas 的胞浆区基因 175~304 氨基酸 (包含其凋亡结构域, 截去其 C 端 15 个氨基酸, 全长 387 bp), 插入 PUC18 载体中进行测序。利用 BLAST 对比分析: 钓取的 Fas 基因片段与 GenBank 中的 Fas 序列完全匹配。将此片段插入 pC4M-FV2E 载体中, 转化 DH5 α , 挑取阳性克隆, 分别利用 *Spe* I 单酶切及 PCR 方法对其进行鉴定。然后利用 PCR 方法扩增 Myr-FKBP12-Fas 融合基因, 克隆进 pEGFP-N1 中, 构建重组质粒 pEGFP-N1/FKBP12-Fas 并利用 *Bam*H I、*Eco*R I 对其进行酶切鉴定。引物设计如下: Fas 片段上游引物为 5'-GGACTAGTAAGAGAA-AGGAAGTACAG 3', 下游引物为 5'-GCTCTAGAA-

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2003CB515508)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66931325, E-mail: crocodillexiao@sina.com

收稿日期: 2004-04-16, 接受日期: 2004-06-30

CTAGTAATGTCCTTGAG 3'; Myr-FKBP12-Fas 融合基因上游引物为 5' CGGAATTCGCGCGTATG-GGGAGTAGCAAG 3', 下游引物为 5'CGGGATCCC-GACTAGTAATGTCCTTGAG 3'.

1.3 稳定细胞表达模型的建立

利用脂质体转染方法将 pEGFP-N1/FKBP12-Fas 转染 HEK293 细胞, 同时做转 pEGFP-N1 质粒的空载对照. 转染方法参见 LipofectAMINE 说明书. 转染 24 ~ 48 h 后, 400 mg/L G418 筛选 10 ~ 15 天, 挑取细胞克隆继续培养.

1.4 RT-PCR 法检测 FKBP12-Fas 融合基因的整合

利用 TRIZOL 一步法提取细胞克隆的总 RNA, 反转录合成 cDNA, PCR 扩增 FKBP12-Fas 融合基因片段, 引物使用 FKBP12 上游引物, Fas 下游引物. PCR 循环反应: 94℃ 1 min, 57℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环. PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖电泳分析鉴定.

1.5 蛋白质印迹检测 FKBP12-Fas 融合蛋白的表达

收集细胞溶于裂解液中 (1×10^{10} 个/L), 4℃ 冰浴 30 min, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清加还原样品处理液, 100℃ 煮 5 min, 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 100 V 恒压 1 h 30 min, 然后将蛋白质样品转移至 NC 膜上, 4℃ 40 V 转印 2 h. 转印膜置 5% 脱脂奶粉中 37℃ 封闭 1 h, 加入一抗: 鼠抗人 FKBP12 腹水 (1:50) (由本室舒琴玲博士制备, 取纯化的人 FKBP12 蛋白免疫的小鼠腹水), 4℃ 孵育过夜或 37℃ 1 h. PBS-T (pH 7.4) 洗膜 3 次, 每次 10 min. 加 HP 标抗鼠二抗 (1:1 000), 室温孵育 45 min 后, PBS-T (pH 7.4) 洗膜 3 次, 每次 10 min. DAB 显色.

1.6 电镜下观察凋亡细胞形态

分别收集细胞样品 (各 1×10^6 个) 送至军事医学科学院仪器分析中心, 制备超薄切片并于电镜下观察细胞形态. 样品包括正常的 293/FKBP12-Fas 细胞以及 AP20187 作用 6 h 后的 293/FKBP12-Fas 细胞.

1.7 “DNA Ladder” 检测

10 nmol/L AP20187 作用阳性细胞克隆 (约 3×10^6 个) 6 h 后, 收集全部细胞, 加 500 μ l 核裂解液, 50℃ 孵育过夜. 酚: 氯仿 (1:1) 抽提 3 次, 取上清加 1 ml 冷无水乙醇, -20℃ 过夜. 10 000 r/min 离心 10 min, 75% 乙醇洗沉淀一次, 室温晾干后, 加 50 μ l TE 缓冲液溶解沉淀. 测 A_{260} 后, 取等量样品 10 g/L 琼脂糖电泳检测, 50 V 2 ~

3 h.

1.8 细胞凋亡率检测

接种细胞于 24 孔板中 (3×10^5 个/孔), 培养 24 h 后, 分别于相应孔中加 AP20187 至终浓度为 5 nmol/L、10 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L, 作用 6 h 后, 利用 Annexin-V apoptosis kit 检测细胞凋亡率.

1.9 竞争性抑制实验

实验前将细胞 1:4 传代, 待长至 80% 以上融片时分别加 AP20187 + FK506 或 Rapamycin: 0 nmol/L + 0 nmol/L; 10 nmol/L + 0 nmol/L; 10 nmol/L + 100 nmol/L; 10 nmol/L + 1 μ mol/L, 作用 6 h 或 12 h 后, 利用 Annexin-V apoptosis kit 检测细胞凋亡率.

2 结 果

2.1 稳定表达载体的构建和鉴定

以 U937 细胞的总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增 Fas 胞浆区 387 bp 的片段. 琼脂糖电泳显示, 扩增出的片段约为 387 bp, 与预计的大小相符 (图 1). 对其进行测序, 结果与 GenBank 中的 Fas 序列完全相符. 将此片段插入 pC4M-FV2E 中, 转化 DH5 α , 挑取阳性克隆, 提取质粒 DNA 并进行酶切鉴定. 如果 Fas 片段重组进了相应的载体中, 则用 *Spe* I 单切应得到一 387 bp 片段 (图 2-2, 3). 如果 Fas 片段为正向插入, 则用 FKBP12 上游引物及 Fas 下游引物可扩增出一 714 bp 片段. 琼脂糖电泳证实成功构建了重组表达载体 (图 2-5, 6). 然后利用 PCR 方法扩增 Myr-FKBP12-Fas 融合基因, 克隆进 pEGFP-N1 中, 利用 *Bam*H I、*Eco*R I 对其进行酶切鉴定 (可切下一约 1.1 kb 大小的片段, 见图 3-2, 3, 4).

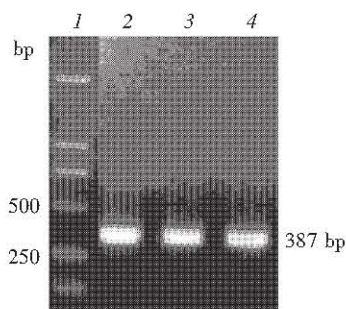


Fig. 1 Amplification of the gene encoding human Fas from 175aa to 304aa containing the death domain

1: DNA marker DL2000; 2, 3, 4: hFas (387 bp).

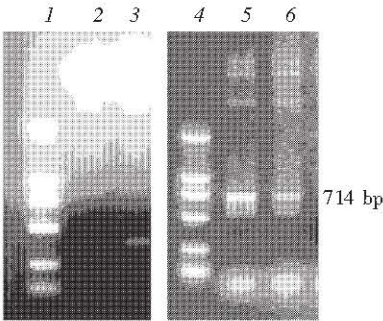


Fig. 2 Restrictive enzyme digestion and PCR analyses of recombinant plasmid pC4M-FV2E/Fas
1, 4: DNA marker DL2000; 2, 3: pC4M-FV2E/Fas cut with *Spe* I ;
5, 6: PCR of FKBP12-Fas fusion gene from pC4M-FV2E/Fas.

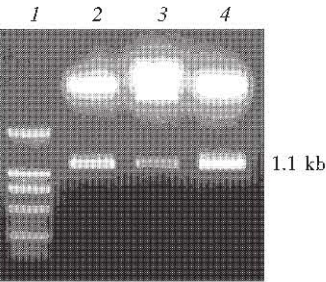


Fig. 3 Restrictive enzyme digestion analyses of recombinant plasmid pEGFP-N1/FKBP12-Fas
1: DNA marker DL2000; 2, 3, 4: pEGFP-N1/FKBP12-Fas cut with *Bam*H I and *Eco*R I .

2.2 稳定细胞表达模型的建立

利用 LipofectAMINE 将重组表达质粒 pEGFP-N1/FKBP12-Fas 导入 HEK293 细胞, 48 h 后 G418 筛选. 两周后出现抗性克隆, 继续扩大培养. 我们

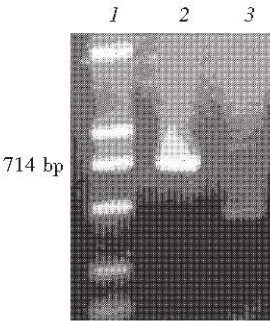


Fig. 4 Analyses of RT-PCR products of FKBP12-Fas from transfective cells by agarose gel electrophoresis
1: DNA marker DL2000; 2: 293/FKBP12-Fas PCR products;
3: 293/N1.

将转染的 HEK293 细胞称为 293/ FKBP12-Fas, 将空载对照称为 293/N1. RT-PCR 检测可见: 筛选出的细胞阳性克隆可扩增出一约 714 bp 大小的条带, 证实其有 FKBP12-Fas 融合基因在 mRNA 水平的表达 (图 4).

另一方面, 利用蛋白质印迹分析, 也可发现: 293/ FKBP12-Fas 细胞克隆在约为 65 ku 处出现明显的特异条带. 而 293/N1 细胞克隆无此带显示 (293/ FKBP12-Fas 及 293/N1 均检测出内源性 FKBP12 蛋白的表达). 从而进一步确证筛选出的细胞克隆为我们所需的阳性克隆 (图 5).

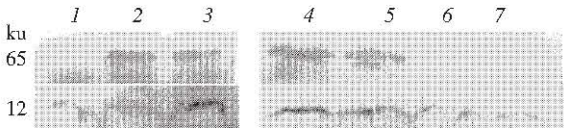


Fig. 5 Detection of expressed FKBP12-Fas fusion protein in transfective cells by Western blotting
1, 6, 7: Stably-transfected 293/N1 clone by FKBP12 Ab; 2, 3, 4, 5: Stably-transfected 293/ FKBP12-Fas clone by FKBP12 Ab.

2.3 稳定细胞表达模型的功能鉴定

293/ FKBP12-Fas 细胞克隆经 10 nmol/L AP20187 作用 6 h 后, 0.25% 胰酶消化收集样品, 送至军事医学科学院仪器分析中心制备超薄切片. 电镜观察显示: 与未加药对照相比, AP20187 作用的细胞表现为核固缩以及染色质边集等典型的凋亡形态 (图 6). 另一方面, DNA 电泳显示: AP20187 处理后的 293/ FKBP12-Fas 细胞的基因组 DNA 呈现 180 ~ 200 bp 间隔的 “DNA ladder” (图 7). 这些均证实: AP20187 的确通过与两个

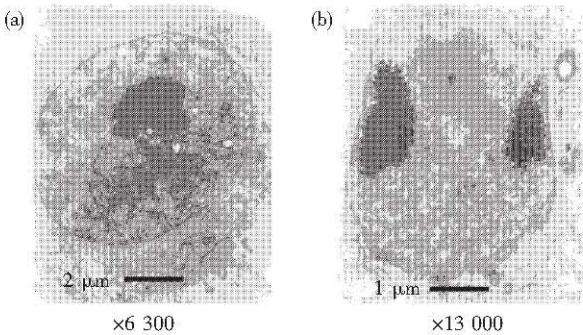


Fig. 6 Observation of apoptosis induced by AP20187 under electron microscopy
1: Normal 293/ FKBP12-Fas cell; 2: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 for 6 h.

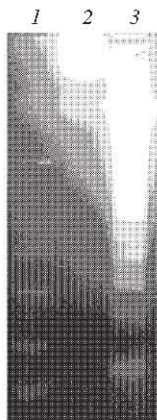


Fig. 7 Analysis of apoptosis induced by AP20187 by agarose gel electrophoresis
1: DL2000; 2: Normal 293/ FKBP12-Fas cell; 3: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 for 6 h.

FKBP12 分子的结合而介导了与后者融合的 Fas 蛋白的双聚, 从而激活了 Fas 介导的细胞凋亡信号转导途径, 导致基因修饰靶细胞的凋亡.

为了进一步对 AP20187 所诱导的 293/ FKBP12-Fas 细胞克隆的凋亡进行量化分析, 我们使用美国 BD 公司的 Annexin-V apoptosis kit 进行检测. 结果显示, 10 nmol/L、50 nmol/L 及 100 nmol/L 作用靶细胞 6 h 后, 分别能导致约 16.36%、30.26% 及 71.63% 的细胞死亡, 其中早期凋亡率分别为 8.52%、21.26% 及 23.61%, 晚期凋亡及坏死细胞率分别为 7.84%、9% 及 48.02%. 由此结果可见: 293/ FKBP12-Fas 细胞克隆呈现出 AP20187 剂量依赖型的细胞凋亡 (图 8).

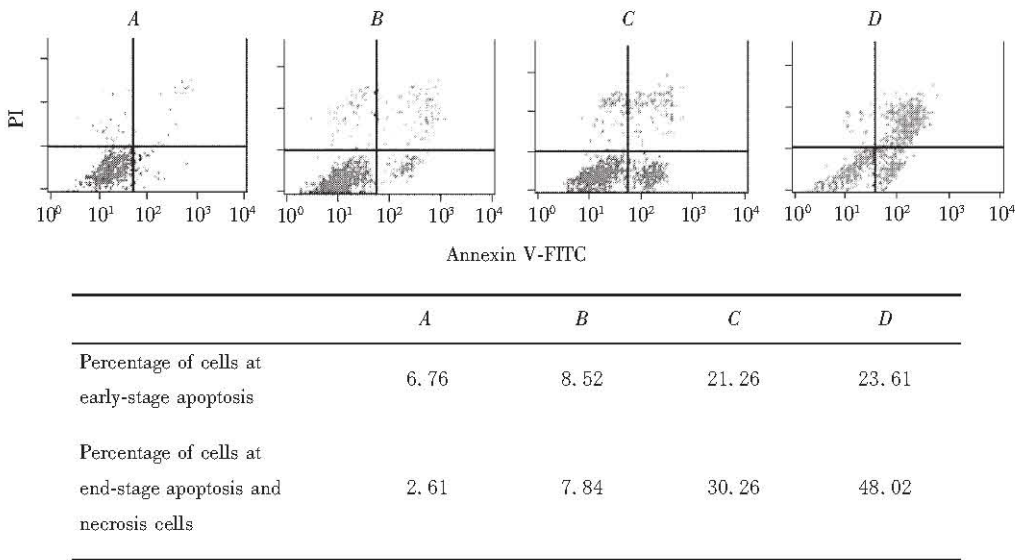


Fig. 8 Apoptosis percent analysis of the 293/ FKBP12-Fas cell induced by AP20187 by flow cytometry
A: Normal 293/ FKBP12-Fas cell; B: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 for 6 h; C: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 50 nmol/L AP20187 for 6 h; D: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 100 nmol/L AP20187 for 6 h.

但是如果在 AP20187 作用 293/ FKBP12-Fas 细胞克隆过程中, 同时加不同浓度的 FKBP12 天然结合蛋白 FK506 或 Rapamycin, 分别作用 6 及 12 h 后, 利用 Annexin-V apoptosis kit 检测细胞凋亡率, FACS (fluorescence activated cell sorter) 结果显示: 1 μ mol/L FK506 几乎能够完全阻断 10 nmol/L AP20187 所诱导的细胞死亡, 而 1 μ mol/L

Rapamycin 能够部分阻断 AP20187 所诱导的细胞死亡. 细胞凋亡抑制率约为 38.62% (图 9 和图 10). FK506 及 Rapamycin 介导的这种竞争性抑制作用进一步证实了: AP20187 的确是通过与 FKBP12 的结合而诱导基因修饰靶细胞的凋亡, 这为我们下一步筛选 FK506 类小分子化合物提供了一个可应用的基础平台.

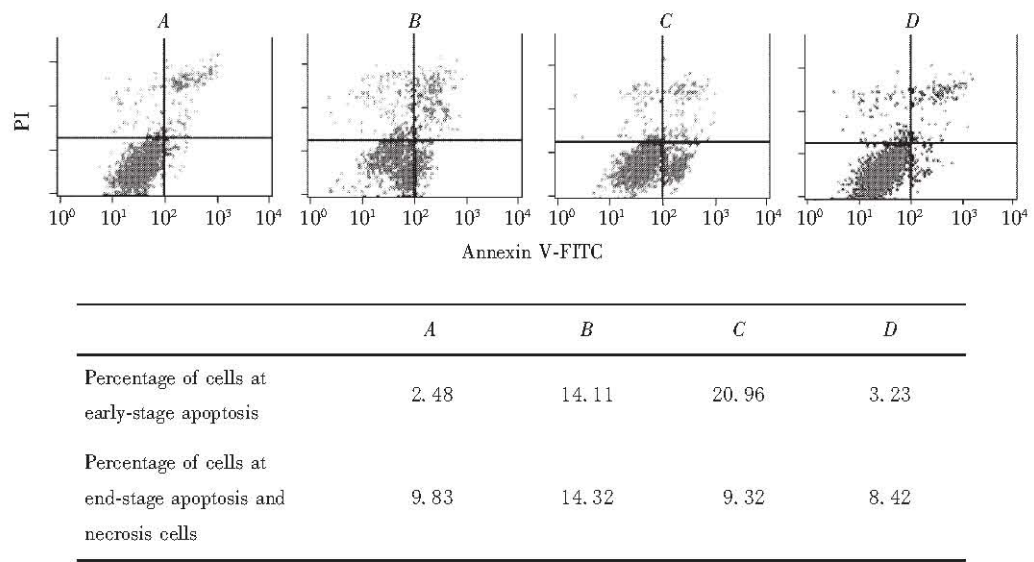


Fig. 9 Analysis of the effect of FK506 on the 293/ FKBP12-Fas cell induced by AP20187 by flow cytometry
A: Normal 293/ FKBP12-Fas cell; B: 293 / FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 for 6 h; C: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 and 100 nmol/L FK506 for 6 h; D: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 and 1 000 nmol/L FK506 for 6 h.

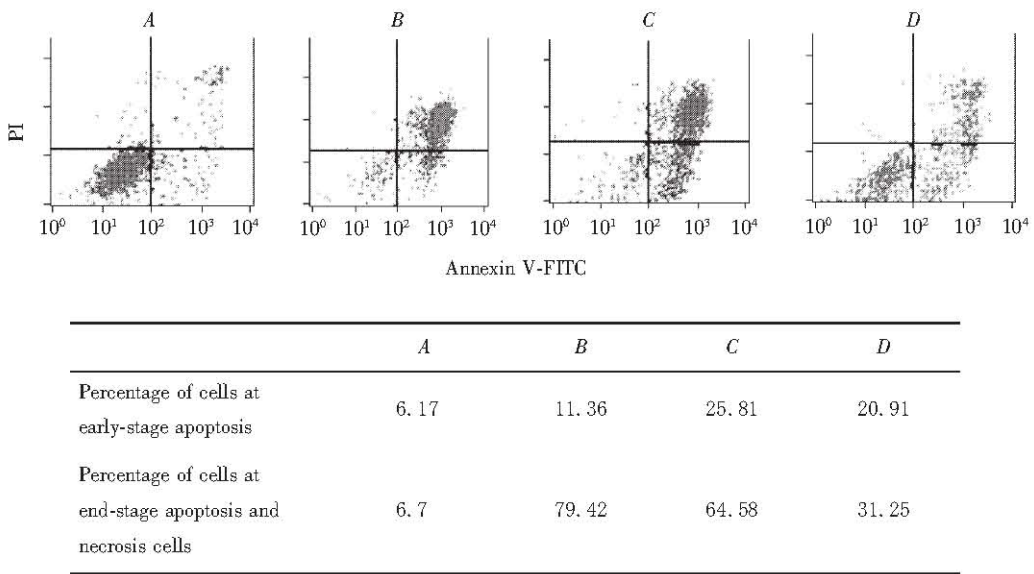


Fig. 10 Analysis of the effect of Rapamycin on the 293 / FKBP12-Fas cell induced by AP20187 by flow cytometry
A: Normal 293/ FKBP12-Fas cell; B: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 for 12 h; C: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 and 100 nmol/L Rapamycin for 12 h; D: 293/ FKBP12-Fas cell induced by 10 nmol/L AP20187 and 1 000 nmol/L Rapamycin for 12 h.

3 讨 论

FK506 是目前临床首选的免疫抑制剂. 1994 年, Lyons 等^[1]研究发现, FK506 还具有神经营养保护作用以及损伤修复再生功能. Becker 等^[2]也

通过实验证实 FK506 能够加速胫骨神经损伤的恢复. 大量的细胞模型及动物模型试验提示, FKBP 类蛋白是介导 FK506 促损伤神经再生作用的靶蛋白. 从结构上来看, FK506 分为两部分: 与 FKBP12 蛋白结合的“结合区”以及与钙调磷酸酶

(CN) 结合的“效应区”。实验证明, FK506 的免疫抑制作用和神经再生作用能够分开, 从而排除了 FK506-FKBPs 复合物通过 CN 途径发挥促神经再生作用。这立即引起了人们极大的兴趣, 人们力求设计和开发一类以 FKBP 为靶点、去除 FK506 的免疫抑制作用 (即去除 FK506 的效应区)、只保留 FK506 促神经再生作用 (即保留 FK506 结合区) 的 FK506 类小分子化合物, 能作为一类新型的神经再生剂用于临床^[3]。近年来, 一些模拟 FK506 结合区合成的不具有免疫抑制作用的 FKBP12 配体已被发现, 它们在体内外实验中均表现出了促神经再生的功能^[4,5]。例如: Guilford 药物所发现合成的 FK506 类似物——GPII046 能够在体外促进 P12 细胞的轴突生长, 在修复神经损伤动物模型中表现出了神经营养因子的特性^[6], 具有潜在的治疗多种神经性疾病的功能, 目前已进入二期临床实验^[7]。另一方面, Bruice 等^[8]利用计算机建模的方法筛选到了类似 Rapamycin 的小分子肽, 它们能够与 FKBP12 结合, 但是不能与 FRAP 结合, 因此成为一类潜在的神经促生剂。Birge 等^[9]通过分子模建设计合成了不具有免疫抑制活性的 FK506 类衍生物 JNJ460, 并通过实验证实 JNJ460 能够诱导新鲜移植的背根神经节的神经节突起, 坐骨神经机械损伤的动物模型经 JNJ460 处理 30 天后, 显示超微结构水平的髓鞘质及轴突肥大。本实验的目的就是通过建立一个 FKBP12/Fas 双聚体可诱导细胞凋亡生物效应的细胞模型, 为这类小分子化合物的初筛提供一个可应用的基础平台。

首先, 我们将人源性 Fas 胞浆区基因插入到 pC4M-FV2E 载体中, 然后利用脂质体转染方法将重组的表达质粒转染进 HEK293 细胞, 通过 G418 加压筛选出阳性克隆后, 分别利用 RT-PCR 及蛋白质印迹方法对 FKBP12-Fas 融合基因的整合及表达进行鉴定, 并利用阳性化合物对所筛选出的阳性克隆进行功能分析。在这里, 阳性化合物是指一类包括 FK1012、AP1510、AP20187 等在内的具有细胞渗透性的化合物, 它们是根据 FK506 的结构人为合成的具有两个 FKBP12 结合位点的化合物。因此当它们进入细胞后, 就会与两个分子的 FKBP12 结合, 从而引起与其融合的 Fas 双聚, 激活 Fas 介导

的细胞凋亡途径, 导致靶细胞的死亡。实验结果显示: 阳性化合物 AP20187 作用靶细胞 6 h 后, 电镜下观察可见明显的核边集; 另一方面, 细胞阳性克隆的基因组 DNA 呈现出典型的“DNA Ladder”, 通过流式细胞术检测亦可看到 AP20187 诱导的具有药物剂量依赖性的细胞死亡。这些均证实, AP20187 的确激活了 Fas 介导的信号转导途径, 导致了基因修饰靶细胞的凋亡, 而 FK506 竞争抑制实验进一步证实: 这一细胞凋亡途径的激活依赖于 AP20187 与 FKBP12 的结合。无疑, 所构建的这种基于 FK506 竞争抑制效应及 FKBP12-Fas 双聚产生细胞凋亡生物效应的细胞模型, 为我们下一步筛选 FK506 类小分子化合物提供了一个可应用的基础平台。

参 考 文 献

- 1 Lyons W E, George E B, Dawson T M, *et al.* Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (8): 3191 ~ 3195
- 2 Becker D B, Jensen J N, Myckatyn T M, *et al.* Effects of FKBP-12 ligands following tibial nerve injury in rats. *J Reconstr Microsurg*, 2000, **16** (8): 613 ~ 620
- 3 舒翠玲, 裴武红, 何有娣. 人 FK506 结合蛋白 (FKBP) 的研究进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, **17** (Suppl): 89 ~ 93
- 4 Shu C L, Pei W H, He Y D. *J Cell Mol Immunol*, 2001, **17** (Suppl): 89 ~ 93
- 4 Steiner J P, Hamilton G S, Ross D T, *et al.* Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 2019 ~ 2024
- 5 Hamilton G S, Steiner J P. Immunophilins: beyond immunosuppression. *J Med Chem*, 1998, **41** (26): 5119 ~ 5143
- 6 Tanaka K, Yoshioka M, Miyazaki I, *et al.* GPII046 prevents dopaminergic dysfunction by activating glutathione system in the mouse striatum. *Neurosci Lett*, 2002, **321** (1~2): 45 ~ 48
- 7 Guo X, Dawson V L, Dawson T M. Neuroimmunophilin ligands exert neuroregeneration and neuroprotection in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*, 2001, **13** (9): 1683 ~ 1693
- 8 Bruice T C, Adalsteinsson H. Generation and evaluation of putative neuroregenerative drugs. part 1: virtual point mutations to the polyketide Rapamycin. *Bioorg Med Chem*, 2000, **8** (3): 617 ~ 624
- 9 Birge R B, Wadsworth S, Akakura R, *et al.* A role for schwann cells in the neuroregenerative effects of a non-immunosuppressive FK506 derivative, JNJ460. *Neuroscience*, 2004, **124** (2): 351 ~ 366

Establishment of a Cell Model Based on FKBP12 Dimerization for Screening of FK506-like Small Molecular Compounds*

XIAO He^{1)**}, YU Ming¹⁾, LI Song²⁾, SHEN Bei-Fen¹⁾, LI Yan¹⁾

(¹⁾ *Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

(²⁾ *Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)*

Abstract The gene encoding the cytoplasmic domain of human Fas from 175aa to 304aa was amplified from U937, which was then determined by sequence analysis and cloned into pC4M-FV2E. The resulting Myr-FKBP12-Fas fusion gene was subcloned into pEGFP-N1. Stable cell clones as named 293/ FKBP12-Fas were obtained by transfecting the recombinant plasmid pEGFP-N1/FKBP12-Fas into HEK293, which was following selected by G418. The integration and expression of FKBP12-Fas fusion gene were identified by RT-PCR and Western-blotting respectively. Both the observation of the condensation and margination of the chomatin on nuclear membrane under electron microscopy and the detection of typical “DNA Ladder” proved the apoptosis induced by AP20187. However, FK506 could competitively block such cell apoptosis, indicating that the inducible apoptosis cell model established as above offered an applicable technical platform for the screening of FK506-like small molecular compounds.

Key words fusion expression, cell model, apoptosis, competitive assays

* This work was supported by a grant from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2003 CB515508).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931325, E-mail: crocodilixiao@sina.com

Received: April 16, 2004 Accepted: June 30, 2004

《中国生物工程杂志》(月刊) 欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《中国生物工程杂志》1976年创刊,为中国科学院主管期刊、中国生物工程学会会刊。本刊现为全国生物科学核心期刊(2004版)、中国科技核心期刊、中国科学引文索引核心期刊、美国化学文摘收录期刊等,具有较大的学术影响,是生命科学与生物产业的主流传播媒介。

《中国生物工程杂志》由中国生物工程学会、中国生物技术发展中心、中国科学院文献情报中心联合主办,主要报道我国生物技术研究开发重要成果和国内外最新进展,反映本学科的学术水平与发展动向,传播生物技术新理论与新技术,促进产业化。本刊内容涉及生物工程及相关领域,包括人类健康与生物技术、农业发展与生物技术、生化工程与生物加工、生态环境与生物技术、海洋生物技术、生物技术产业化等。

本刊发行覆盖全国各省、自治区、直辖市以及香港、台湾地区,海外的有关大学、研究机构、图书馆有大量的订户,和国外建立有广泛的刊物交换联系。

《中国生物工程杂志》为月刊,全年12期订费共300元,邮发代号82-673,可在编辑部直接订阅。

通信地址:北京市中关村北四环西路33号,邮政编码:100080,电话:010-82624544(传真),010-82626611-6631,电子邮箱:biotech@mail.las.ac.cn