

重组 NuBCP-9 / Tumstatin (74-98)融合多肽的构建、表达和活性研究

杨家森, 邹佳宁, 方威, 邢莹莹, 奚涛*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 目的: 构建抗肿瘤融合肽 NuBCP-9/Tumstatin (74-98) (简称 NT) 原核表达载体并转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 获得具有多靶点抗肿瘤活性的融合肽。方法: 将抗肿瘤小肽 NuBCP-9和 Tumstatin (74-98)用柔性肽 (G_4S)₃ 连接, 根据大肠杆菌偏爱密码子, 采用重叠延伸 PCR 技术扩增融合肽序列, 并将其克隆至 pET32a(+) 质粒中, 构建 pET32a-NT 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 诱导表达, SDS-PAGE 分析目的蛋白表达量并优化表达条件, 经亲和色谱、酶切和超滤等方法分离、纯化得到重组融合肽; 采用 MTT 法测定融合肽对人脐静脉内皮细胞 ECV304 和人肺癌细胞 A549 的抑制活性影响。结果: 成功构建了重组表达载体 pET32a-NT, 优化表达条件获得了 25% 的可溶性蛋白表达量。活性研究表明, 在融合肽终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 ECV304 和 A549 的抑制率分别为 60.8% 和 65.2%。结论: 融合肽初步表现出抗肿瘤活性, 为进一步药效药理学研究奠定了基础。

关键词 NuBCP-9; 肿瘤抑素; 融合多肽; 抗肿瘤; 原核表达

中图分类号 R378.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000 - 5048 (2009) 04 - 0364 - 06

Construction, expression and activity evaluation of recombinant NuBCP-9 / Tumstatin (74-98) fusion polypeptide

YANG Jia-sen, ZOU Jia-ning, FANG Wei, XING Ying-ying, XI Tao*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To construct a prokaryotic expression vector carrying NuBCP-9-tumstatin (74-98) (abbreviated as NT) gene and to obtain the fusion peptide with antitumor activity. Methods: Nucleotide sequences of antitumor peptides, NuBCP-9 and Tumstatin (74-98), were connected via a linker (G_4S)₃ based on biased codons of *E. coli* the fused NT gene was reconstructed using SOE PCR, and inserted into pET32a(+) vector, and transformed in *E. coli* BL21 (DE3). After expression, the novel fusion peptide was purified through nickel-affinity chromatography, Factor Xa digestion and ultrafiltration. Biological activity of the fusion peptide on ECV304 and A549 cells was evaluated by MTT assay. Results: A prokaryotic expression system with NT gene was successfully constructed. The soluble fusion peptide was accounted for approximately 25% when induced by 0.5 mmol/L IPTG at 30 for 4 h. The purified fusion peptide could inhibit cell growth of ECV304 and A549 with inhibition rates of 60.8% and 65.2% at 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Conclusion: A novel fusion peptide with antitumor activity was cloned, expressed and purified.

Key words NuBCP-9; tumstatin; fusion polypeptide; antitumor; prokaryotic expression

NuBCP-9 (Nur77-derived Bcl-2-converting peptide with 9 amino acids) 是受体 Nur77 (nuclear receptor 77) 蛋白上的一段短的序列, 能够直接作用于 Bcl-2, 使 Bcl-2 从一种能够保护癌细胞免受程序

性死亡调控的蛋白转变为一种能够杀死癌细胞的蛋白, 在体内外都显示了很好的诱导肿瘤细胞凋亡的活性^[1-2]。肿瘤抑素 (Tumstatin) 则从另一个角度抑制肿瘤, 它是一种来源于基膜胶原 (Col IV)

的蛋白片断,具有抗肿瘤新生血管生成的活性,能特异性地抑制肿瘤血管内皮细胞蛋白的合成,进而抑制肿瘤细胞的增殖^[3]。Maeshima等^[4]通过缺失突变的方法证明肿瘤抑素的抗肿瘤新生血管生成活性位于被称为 Tum5的 54~132位氨基酸。进一步研究证明^[5],抗肿瘤新生血管生成活性区被定位于被称为 T7片断的 74~98位氨基酸,它具有与全长肿瘤抑素相同的抗血管生成活性。

抗肿瘤药物的研究越来越趋向于肿瘤的靶向和综合性治疗,把具有不同抗肿瘤作用机制的活性肽利用基因重组方法连接起来进行大规模发酵生产不失为明智之举。本研究按照细菌密码子的偏爱性优化了 NuBCP-9和 Tum statin (74-98)的编码序列,用柔性肽(G_4S)₃连接并构建大肠杆菌表达载体 BuBCP-9/Tum statin (74-98)(简称 NT),采用 BL21(DE3)作为表达菌株,使其得到了高效表达。

材 料

1.1 菌株、质粒和细胞

大肠杆菌 *E. coli* DH5, *E. coli* BL21(DE3), 载体

pET32a(+), 人肺癌细胞株 A549、人脐静脉内皮细胞 ECV304均为本实验室保存。

1.2 试剂及工具酶

Taq DNA 聚合酶(上海生物工程技术服务有限公司);限制性内切酶 *EcoR*、*Hind* 及 *T4* DNA 连接酶(立陶宛 MB I Fermentas公司); α 因子蛋白酶(美国 NEB 公司);凝胶回收试剂盒(北京天根生物技术有限责任公司)。

方 法

2.1 NT融合肽基因的合成

根据 NuBCP-9和 Tum statin (74-98)的氨基酸序列和大肠杆菌对密码子^[6]的偏爱性进行序列设计,并利用 Primer Premier 5.0软件根据引物设计原则对序列进行适当调整,使其更利于 PCR,寡聚核苷酸引物序列见表 1。在引物 P1f中导入了限制性酶切位点 *EcoR* 和蛋白酶切位点 α 因子蛋白酶,在引物 P4r导入了限制性酶切位点 *Hind* 和终止密码子 TAA,以利于载体构建和分离纯化。寡核苷酸长度为 59个碱基,链间互补区为 19个碱基。

Table 1 Sequence of oligos P1-P4

No.	Oligo sequence (from 5' to 3')	Enzyme digestion site
P1f	GACGAAATTC AATTGAGGGTCCG TTTAGCCGTAGCCTGCA TAGCCTGCTGGGCGGTGGTGG	<i>EcoR</i> I, Factor Xa Protease
P2f	CCTGCTGGGCGGTGGTGGCA GCGGTGGGCGGTGGCTCTGGTGGGCGGTGGCA GCACCA TGC	-
P3r	GCAAAA TTGCACACA TCA TTCACA TTGCAAAAACA GAAACGGCA TGGTGTCTGCCACCGCC	-
P4r	CGCAA GCTT TTTACA GCCAA TAGCTA TAA TCA TTACGGCTCGCAAAA TTGCACACA TCA T	<i>Hind</i> III

重叠延伸 PCR 技术^[7](splicing by overlap extension PCR,简称 SOE PCR)两步扩增出 NuBCP-9/ (G_4S)₃/Tum statin (74-98)融合肽基因。第 1步 PCR:以 P2f和 P3r互为模板,加入 *Taq*酶及相关反应体系,94 3 min; 55 2 min; 72 10 min获得双链片段。第 2步 PCR:以第 1次 PCR 产物为模板,加入引物 P1f和 P4r,按下列条件进行 PCR 扩增:94 4 min; 94 50 s; 60 50 s; 72 1 min,循环 29次后 72 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测融合肽基因合成情况。

2.2 NT融合肽表达载体的构建

将 SOE PCR 所得到的产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后,DNA 片段 NT用 *EcoR* 和 *Hind* 消化,并与经同样内切酶消化的大肠杆菌表达载体 pET32a(+)连接,形成 NT融合蛋白表达载体 pET32a(+)-NT,转化大肠杆菌 DH5,氨苄青霉素

抗性筛选出阳性克隆菌株。DNA 的酶切、连接、转化等分子生物学操作按文献 [8]进行。

2.3 融合蛋白的诱导表达

将得到阳性重组质粒 pET-NT转化大肠杆菌 BL21(DE3),得到重组菌株 pET-NT/BL21(DE3)。将重组菌 pET-NT/BL21(DE3)接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养液中,37 活化过夜后,按体积分 1%接种于含氨苄青霉素的新鲜 LB 液体培养液中,培养至对数生长期 (A_{600} 为 0.4~0.6),加 0.5 mmol/L IPTG诱导表达重组蛋白,分别于 25, 30, 37

下继续培养 5 h。分别收集菌体,重悬于 PBS(pH 7.4)中,超声破碎细胞,离心后的上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE电泳,观察可溶性表达情况。并选择合适的温度,诱导表达 1~6 h,确定其诱导时间。用 BandScan软件进行分析,测定表达产物占菌体总蛋白的相对含量,观察其表达量以及可溶性情况。

2.4 融合蛋白 TrxA-NT 的纯化

由于 TrxA 是高度可溶的,目的融合肽以可溶形式表达,大量表达后离心收集菌体,并用含 20 mmol/L 咪唑的 NTA-Resin Buffer 重悬,反复冻溶后超声破碎细胞,离心收集上清。

pET32a(+)表达的 TrxA-NT 中带有 6 × His 标签,故上清用亲和色谱 NTA Resin 分离纯化。将上清用 0.45 μm 滤膜过滤,按照说明书要求上柱,并分别用 50, 100, 200 和 300 mmol/L 咪唑进行梯度洗脱,根据核酸蛋白检测仪的吸光度分别收集,SDS-PAGE 检测融合蛋白的纯化效果。

2.5 融合肽的制备

融合蛋白 TrxA-NT 用 α 因子蛋白酶酶切。每毫克融合蛋白加 1.5 个单位的蛋白酶,在裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂) 中 21 °C 孵育 6 h。酶切产物用 10 kD 的超滤膜将蛋白酶、TrxA 及未切开的融合蛋白去除,再用 Sephadex G-25 除盐,冻干即可得到高纯度的融合肽。纯化的情况用 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测。

2.6 融合肽的体外活性分析

2.6.1 融合肽对人脐静脉内皮细胞 ECV304 的影响

人脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞用含 10% 小牛血清 (FCS)、100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 传代 1 次。

取对数生长期细胞,以每孔 5 × 10³ 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔加入细胞悬液 180 μL,在细胞培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后加入不同浓度的融合肽 20 μL,使其终浓度分别为 1, 5, 10, 15, 20 μmol/L,阳性对照为 15 μmol/L 恩度 (Endostar),空白对照组加入相同体积 PBS,每组设 3 个复孔,分别处理 48 h。培养结束前 4 h 于 96 孔培养板中每孔吸取培养基 120 μL,并加入 5 g/L 的 MTT 液 20 μL,置培养箱中继续培养 4 h 后轻轻吸去培养基,然后每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min 使蓝紫色沉淀充分溶解;用酶标仪 (ELX-800 型) 570 nm 和 630 nm 双波长测定吸光度 (A)。抑制率的计算方法是:抑制率 = [(A_{control} - A_{test}) / A_{control}] × 100%。以上实验重复 3 次。

2.6.2 融合肽对人肺癌细胞 A549 的影响

人肺癌细胞 A549 用 1640 培养基培养,阳性对照药为

5 μmol/L 顺铂,其他条件同 ECV304。

结果

3.1 NT 融合肽基因的合成

考虑到融合肽的活性情况以及 PCR 的引物需要,并根据大肠杆菌密码子偏爱性,氨基酸及核酸序列设计如图 1 所示。

<u>I</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	—— NuBCP-9
att	gag	ggt	cgc	ttt	agc	cgt	agc	ctg	cat	
<u>S</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	—— Linker
agc	ctg	ctg	ggc	ggt	ggt	ggc	agc	ggt	ggc	
<u>G</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>M</u>	
ggt	ggc	tct	ggt	ggc	ggt	ggc	agc	acc	atg	
<u>P</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	
cgc	ttt	ctg	ttt	tgc	aat	gtg	aat	gat	gtg	
<u>C</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	
tgc	aat	ttt	gcg	agc	cgt	aat	gat	tat	agc	
<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	*							
tat	tgg	ctg	taa							

Figure 1 Designed DNA sequence and amino acid sequence of NuBCP-9/Tumstatin (74-98) (abbreviated as NT)

The amino acid sequence of the peptide recognized by Factor Xa, NuBCP-9, the linker and Tumstatin (74-98) are denoted with underline, double line, pane and broken line, respectively

利用 SOE PCR 法,以 4 条合成的寡聚核苷酸为引物,经过两次 PCR,扩增出大小约为 180 bp 的片段,与目的片段大小相符,见图 2。

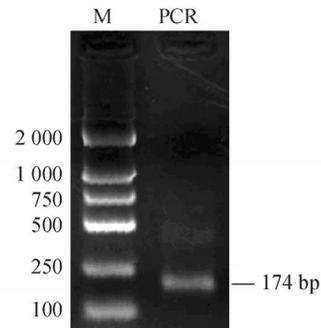


Figure 2 Intact fusion polypeptide NT was amplified by the SOE PCR M: DL2000 marker; Lane PCR: the target gene fragment by the SOE PCR

3.2 pET-NT 重组质粒的鉴定

提取氨苄青霉素抗性克隆质粒,进行酶切鉴定,在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中见到约 180 bp 大小的目的条带,而空质粒中未见此片段,说明目的序列已成功克隆到 pET32a 中 (见图 3)。重组质粒送 Invitrogen 公司测序,进一步证实了 pET-NT 重组质粒成功构建。测序结果显示,融合肽编码序列的插

入位点、拼接顺序及编码碱基与设计相符,能够按照预期的读码方式翻译出目的融合肽。

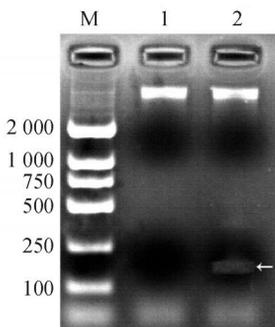


Figure 3 Identification of recombinant pET32a-NT by restriction enzyme digestion

M: DL2000 marker; Lane 1: pET32a(+) vector digested by EcoR I/Hind III; Lane 2: recombinant pET32a-NT digested by EcoR I/Hind III. The arrowhead indicates the target gene fragment

3.3 融合蛋白基因的诱导表达

将 pET-NT质粒再转化大肠杆菌 BL21,得到表达菌株,分别在 25, 30, 37 诱导表达 5 h,超声波破碎后,上清液和沉淀分别电泳,发现表达菌株在 3 个温度下可溶性表达量都很高,在 30 的诱导下表现尤为明显(结果未列出)。选择最佳诱导温度 30 进行诱导,分别取不同诱导时间的菌体进行检测,发现目的蛋白在 1 h 就开始表达,随着诱导时间的增加表达量逐渐增加,在诱导 4 h 后增加不再明显,其含量约占蛋白总量的 25% (见图 4)。

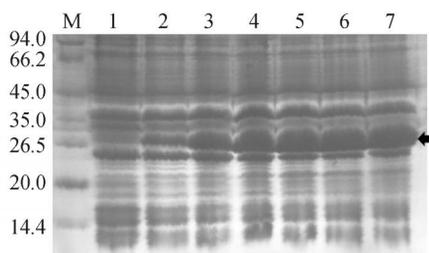


Figure 4 SDS-PAGE analysis of expression protein induced for different time with 0.5 mmol/L IPTG at 30

M: Marker; Lane 1-7: Induced for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h, respectively. The arrowhead indicates the target protein

3.4 融合蛋白 Trx A-NT 的分离纯化

融合蛋白 Trx A-NT 经梯度洗脱后, SDS-PAGE 电泳收集的洗脱液发现,目的蛋白在 100 mmol/L 咪唑就有部分被洗脱, 200 mmol/L 咪唑得到纯度高达 99% 的融合蛋白,并且与预期蛋白相对分子质量相符(见图 5)。

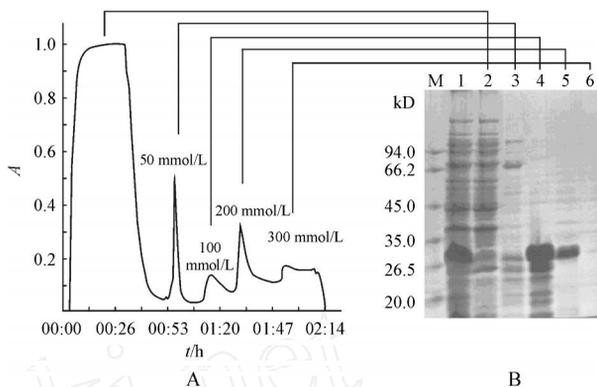


Figure 5 Affinity chromatography(A) and SDS-PAGE analysis(B) of the fusion protein at purification stages

M: Protein marker; Lane 1: Soluble total proteins of pET-NT/BL21 (DE3); Lane 2: Proteins penetrated from the Ni²⁺-NTA resin when Sampling; Lane 3-6: Eluted from the Ni²⁺-NTA resin with 50, 100, 200, 300 mmol/L imidazole, respectively

3.5 融合肽的制备

将纯化的融合蛋白 Trx A-NT 经 a 因子蛋白酶酶切,酶切产物用 10 kD 的超滤膜将蛋白酶、TrxA 及未切开的融合蛋白去除,再用 Sephadex G-25 除盐,纯化后冷冻干燥得到最终产品融合肽 NT(图 6)。

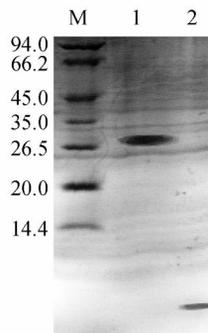


Figure 6 Cleavage and purification of fusion protein Trx-NT

M: Protein marker; Lane 1: Purified fusion protein Trx-NT; Lane 2: Resulting final purified NT fusion peptide

3.6 融合肽的体外活性分析

将 5 × 10³ 个人脐静脉内皮细胞 ECV304 和人肺癌细胞 A549 与不同浓度的融合肽 NT 共同孵育 48 h 后,经 MTT 比色测定 A₄₉₀,并通过对空白对照组相比较计算融合肽 NT 对细胞增殖的抑制率。结果表明,融合肽 NT 对人脐静脉内皮细胞和肺癌细胞的增殖都显示出良好的抑制作用,并呈剂量依赖性。在浓度为 20 μmol/L 时,抑制率相对空白分别达到 60.8% 和 65.2% (见图 7),但其作用都低于阳性对照药。

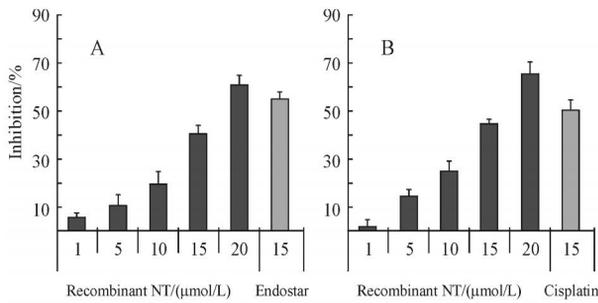


Figure 7 Inhibition of recombinant NT on proliferation of human umbilical vein vascular endothelial cells ECV304 (A) and human lung adenocarcinoma A549 (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

讨论

由于肿瘤发生的复杂性,单因素及单靶点治疗已显弊端,因此,现在的肿瘤治疗更趋向于综合治疗。多种药物联合治疗已成为近几年肿瘤治疗研究的热点,并逐渐显示出其增强疗效、减少不良反应、延缓肿瘤细胞的抗药性等优点,减少了抗肿瘤药物的使用剂量。在诸多抗肿瘤药物中,多肽类药物因其相对分子质量小、无免疫原性、结构简单、副作用小等优点越来越受到人们的重视,尤其是来源于人类自身蛋白的多肽。但是多肽类药物往往存在作用途径简单、治疗效果相对较差等弊端,如何扬长避短,充分发挥多肽类药物作用成为亟待解决的课题,蛋白及多肽融合技术无疑是解决这类问题的有效途径。

Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) 基因是一种原癌基因^[9-10],它具有抑制凋亡的作用,可增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗力,抑制大多数化疗药物所引起的靶细胞凋亡,在大多数肿瘤细胞中高效表达,因此很多药物都以此为靶点进行筛选。目前以 Bcl-2 为靶标的药物多数是用反义核酸来抑制 Bcl-2 的表达,或者用 BH3 (Bcl-2 homolog 3) 肽及类似物结合于 Bcl-2 的 BH3 结合袋处来消除它的活性^[11-12]。NuBCP-9 是受体 Nur77 蛋白上的核心序列,能够与 Bcl-2 作用于 BH3 结合域并成为 Bcl-2 死亡构象的一种转换器,显示其抗肿瘤活性^[11]。

肿瘤的生长和转移也离不开新生血管的生成,肿瘤抑素继血管生成抑素和内皮抑素之后,最新发现的源于人基膜 Col1 的肿瘤新生血管生成的抑制因子,具有明显的抑制肿瘤新生血管生成和诱导其内皮细胞凋亡的活性。研究表明,其核心序列

Tum statin (74-98) 以非 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列结合于整合素 α_3 ,能有效抑制内皮细胞蛋白质合成,抑制内皮细胞增殖,诱导内皮细胞凋亡,进而特异地抑制肿瘤细胞的增殖,而对于生理性血管生成(包括发育和修复相关的血管生成)没有影响^[15]。

NuBCP-9 和 Tum statin (74-98) 都是来源于人类自身蛋白的功能多肽,本研究用柔性肽 (G_4S)₃ 连接,以充分暴露出 NuBCP-9 和 Tum statin (74-98) 的作用位点,发挥其多靶点抗肿瘤活性的作用,并且在大肠杆菌中实现了高效表达。

本研究首次将二者以柔性肽 (G_4S)₃ 连接的方式获得了融合肽基因序列,构建了 pET-NT 的表达载体,并利用大肠杆菌进行了表达。为了提高目的融合肽的表达量和克服分子小肽易被蛋白酶所降解的缺点,选用融合表达的策略,为成功表达奠定了基础。pET32a 中的 TrxA 基因源于细菌本身,其蛋白具有良好的可溶性,故有利于提高融合靶蛋白的溶解性。结果表明,目的融合肽与 TrxA 蛋白一起可溶性表达。设计中,利用密码子使用偏好原则选用了有利于大肠杆菌高效表达的密码子,同时加入了蛋白酶识别序列作为融合蛋白的裂解位点,成功构建了可获得融合肽的重组载体 pET32a-NT,为获得具有生物活性的融合肽 NT 创造了条件。

本研究优化了表达条件,发现融合蛋白 TrxA-NT 在 30℃ 诱导表达 4 h 时效果最佳,可溶性表达量约占总可溶性蛋白的 25%;并根据承载蛋白的特点选择镍柱亲和色谱纯化,咪唑梯度洗脱,表明最佳的洗脱浓度为 200 mmol/L,获得了纯度大于 99% 的融合蛋白溶液。利用目的融合肽与 TrxA₁₋₁₀ 因子相对分子质量差别较大的特点,采用超滤膜过滤的方法获得纯度达 96% 的融合肽,脱盐冻干即成功获得了融合肽 NT 冻干粉。活性测定结果显示,融合肽 NT 对人脐静脉内皮细胞 ECV304 和人肺癌细胞 A549 都有较强的抑制作用,初步显示了其具有多重抗肿瘤活性。对于其深入的作用机制还需进一步研究,以期开发出一种新型高效、低毒,并具有良好临床应用前景的抗肿瘤活性药物。

参考文献

- [1] Kolluri SK, Zhu XW, Zhou X, et al. A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(4): 285 - 298.

- [2] Lin B, Kolluri SK, Lin F, *et al* Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3[J]. *Cell*, 2004, **116**(4): 527 - 540.
- [3] Ortega N, Werb Z New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens[J]. *J Cell Sci*, 2002, **115**(22): 4 201 - 4 214.
- [4] Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, *et al* Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tum statin[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(18): 15 240 - 15 248.
- [5] Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, *et al* Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha (v) beta (3) integrin and inhibits angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(34): 31 959 - 31 968.
- [6] Kane JF Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6**(5): 494 - 500.
- [7] Horton RM, Cai ZL, Ho SN, *et al* Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction [J]. *Biotechniques*, 1990, **8**(5): 528 - 535.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 3版. 北京: 科学出版社, 2004: 68 - 711.
- [9] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2003, **22**(53): 8 590 - 8 607.
- [10] Green DR, Kroemer G The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. *Science*, 2004, **305**(5 684): 626 - 629.
- [11] Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, *et al* Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**(2): 173 - 182.
- [12] Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, *et al* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours [J]. *Nature*, 2005, **435**(7 042): 677 - 681.

· 企业介绍 ·

广州知心堂生物科技有限公司

广州知心堂生物科技有限公司是一家致力于生命健康前沿领域研究的高科技生物工程公司。本着“相识、相知、志同道合、结盟未来、价值共享”的创业理念于 2002 年 8 月在广州成立。

六年来,嘉福临人在政府和社会各界的大力支持下,打造并形成了以亚洲慢性疾病控制研究中心、上海医工院为核心,包括中国药科大学、南方医科大学、胡庆余堂等科研机构在内的强大知心科技联盟,形成了以蒜氨酸为核心的立体产品体系并提出“吃、喝、睡、学、乐”的立体健康管理理念,实现了科研、生产、品牌、销售四位一体的发展战略。

十年磨一剑,嘉福临的网络现遍及全国 28 个省,100 多个大中城市,使嘉福临在几年内成为生物蒜制剂中国第一品牌。其产品的卓越品质得到近 700 万消费者的认同,嘉福临系列高科技产品先后被中国中医药领域最权威、最专业的中华中医药学会评为“中华中医药学会推荐产品”;被中国保健科技学会信誉保证企业管理委员会评定为“中国保健品信誉保证产品”;被中国质量监督检验协会等单位联合评定为“中国市场公认畅销知品牌”称号,获中国保护消费者基金会“3.15 全国质量、服务双保信誉产品”称号。

2008 年 1 月 6 日,经过国家卫生部、国家中医药管理局、中国老年保健协会、中华中医药学会、中国健康促进基金会等国家相关部门、研究机构严格考核、缜密筛选,一致认定嘉福临立体健康管理理念和系列立体健康产品,不但符合中国传统中医养生理念,也与现代科学保健的观念相吻合,更与世界卫生组织所倡导的健康管理要求一致。因此,共同授权嘉福临作为中国立体健康教育全国唯一推广单位,并在北京人民大会堂为中国老年保健协会立体健康教育中心揭牌,任命嘉福临董事长韩洪建为立体健康教育中心副主任,主抓立体健康中国行的具体工作!

嘉福临立体健康中国行的正式启动,标志着嘉福临成为中国保健产业的新锐力量。