

性别及日龄对转人神经生长因子基因小鼠唾液中蛋白分泌的影响

廖莎¹, 朱庆春¹, 吴珍芳¹, 李紫聪¹, 曾芳^{1,2}

1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642

2 华南农业大学 海洋学院, 广东 广州 510642

廖莎, 朱庆春, 吴珍芳, 等. 性别及日龄对转人神经生长因子基因小鼠唾液中蛋白分泌的影响. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1041–1049.

Liao S, Zhu QC, Wu ZF, et al. Effects of gender and age on protein secretion in saliva of transgenic mice expressing human nerve growth factor. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 1041–1049.

摘要: 神经生长因子 (Nerve growth factor, NGF) 是一种能促进神经元发育、分化、再生的蛋白。为高效生产药效更佳的人源 NGF (hNGF) 药物, 笔者实验室构建出唾液腺特异表达 hNGF 的转基因小鼠, 并从该转基因小鼠唾液中纯化获得具有高生物学活性的 hNGF 蛋白。为了选择性别和日龄最适宜的转 hNGF 基因小鼠用于收集纯化 hNGF 蛋白, 文中比较了 28 日龄 (性成熟前) 雄性、雌性, 63 日龄 (性成熟后) 雄性、雌性转 hNGF 基因小鼠, 共 4 组转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液量、唾液总蛋白量、唾液鼠源 NGF (mNGF) 蛋白量和唾液 hNGF 蛋白量等指标。结果显示, 63 日龄的转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液量、唾液总蛋白量、唾液 mNGF 蛋白量和唾液 hNGF 蛋白量显著高于 28 日龄同一性别的转 hNGF 基因小鼠, 且 63 日龄的雄性转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液 hNGF 蛋白量显著高于同一日龄的雌性转 hNGF 基因小鼠; 在 4 组小鼠中, 63 日龄的雄性转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液 hNGF 含量最高, 比 28 日龄雌性转 hNGF 基因小鼠高出约 46 倍, 最适宜用于收集唾液并从中纯化 hNGF。

关键词: 转基因小鼠, 性别, 日龄, 人神经生长因子, 唾液

Effects of gender and age on protein secretion in saliva of transgenic mice expressing human nerve growth factor

Sha Liao¹, Qingchun Zhu¹, Zhenfang Wu¹, Zicong Li¹, and Fang Zeng^{1,2}

1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 College of Marine Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: Nerve growth factor (NGF) can promote the development, differentiation and regeneration of neurons. Recently,

Received: November 12, 2018; **Accepted:** February 27, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31601911).

Corresponding author: Fang Zeng. Tel: +86-20-85284985; Fax: +86-20-85280369; E-mail: zengf8210@163.com

国家自然科学基金 (No. 31601911) 资助。

网络出版时间: 2019-03-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190318.1121.001.html>

in order to efficiently produce human NGF (hNGF) drugs with better efficacy, we created transgenic mice expressing hNGF specifically in their salivary glands, and purified highly active hNGF protein from their saliva. Some studies reported that the NGF secretion in mouse saliva is affected by gender and age. Here, in order to select hNGF transgenic mice with high NGF secretion for saliva collection and hNGF purification, we divided transgenic mice into 4 groups, including 28-day-old young males and females, 63-day-old adult males and females. We compared their saliva volume, total salivary protein amount, salivary mNGF protein amount and salivary hNGF protein amount. The results showed that the saliva volume as well as amounts of total salivary protein, salivary mNGF protein and salivary hNGF protein secreted by 63-day-old transgenic mice were significantly higher than those secreted by sex-match 28-day-old transgenic mice, and the salivary hNGF protein amount secreted by male transgenic mice at the age of 63 days was significantly higher than that of female transgenic mice at the same age; Among 4 groups of mice, 63-day-old male transgenic mice secreted the highest salivary hNGF content, which was about 46 times higher than that secreted by the 28-day-old female transgenic mice. Therefore, 63-day-old male transgenic mice should be selected for saliva collection and hNGF purification.

Keywords: transgenic mice, gender, age, human nerve growth factor, saliva

神经生长因子 (Nerve growth factor, NGF) 是一种具有神经元营养和促进突起生长的神经细胞生长调节因子。它对中枢及周围神经元的各种生理过程具有重要的调控作用。NGF 在 1952 年被首次发现^[1], 后续研究证明, NGF 对治疗各种神经损伤或退行性疾病具有明显的效果^[2]。由于对 NGF 的发现和研作出了巨大的贡献, 生物学家 Cohen 和 Levi-Montalcini 获得了 1986 年的诺贝尔医学生理学奖^[3-4]。从 2002 年至今, 中国政府已批准 4 种 NGF 药物 (商品名分别为恩经复、苏肽生、金路捷和丽康乐) 上市用于治疗人类神经相关疾病, 该 4 种药物均提取自小鼠唾液腺, 属于鼠源 NGF (mNGF), 且该类药物的价格非常昂贵, 约 1 万元/mg。虽然 mNGF 与人 NGF (hNGF) 同源性高^[5], 且对人类神经相关疾病具有确实疗效, 但 mNGF 用于人类疾病治疗仍然存在免疫原性问题^[6]。且已有研究表明, mNGF 活性比 hNGF 低^[7], 所以非常有必要研发 hNGF 药物。

迄今为止, 有不少研究尝试利用各种方法来制备 hNGF, 如利用大肠杆菌表达系统^[8-9]、酵母表达系统^[10]、昆虫^[11-12]或哺乳动物细胞^[13-14]表达系统等, 但因为上述表达系统存在翻译后修饰缺陷、产量低、成本高等问题而达不到理想效果。还有研究利用转基因兔乳腺作生物反应器制备

hNGF^[15]。但乳腺生物反应器存在性别和表达时期的限制, 即必须在雌性动物的泌乳期才能表达目的蛋白, 且乳中蛋白量及种类繁多, 不利于纯化目的蛋白。许多动物在唾液腺中高水平表达高活性的内源 NGF, 这说明, 动物唾液腺是 NGF 蛋白合成的理想场所。此外, 以动物唾液腺作生物反应器表达外源蛋白还受性别和表达时期的限制, 且唾液中蛋白量及种类较少, 有利于外源蛋白纯化。基于动物唾液腺的以上优点, 本实验室曾芳等^[16]已生产出唾液腺特异表达 hNGF 的转基因小鼠, 并从其唾液中纯化获得了比 mNGF 有更高生物活性的 hNGF 蛋白, 但该转基因小鼠的 hNGF 蛋白平均产量仍有待提高。

已有研究表明, 小鼠唾液中的 NGF 蛋白分泌量存在明显的性别差异, 雄性小鼠唾液腺中 NGF 的 mRNA 表达量显著高于雌性小鼠, 且雄性小鼠唾液中的 NGF 蛋白量显著高于雌性小鼠, 同时研究数据显示, 成年 (56 日龄以上) 雄鼠下颌唾液中 NGF 浓度显著高于幼年 (30 日龄左右) 雄性小鼠^[17-18]。另有研究表明, 小鼠子宫组织中的 NGF 表达量随日龄增加而增加, 在 30 日龄达到峰值, 成年后维持在一定水平^[19]; 陆璐等^[20]研究发现新生小鼠颌下腺不表达 NGF, 雄性小鼠 2 周龄左右才检测到 NGF 的表达信号, 此后随日龄的增加而

增加, 1 月龄左右时雄性小鼠颌下腺中 NGF 的 mRNA 迅速增多, 到 2 月龄时 NGF 的 mRNA 持续保持较高水平转录。这些研究说明性别和日龄会影响小鼠 NGF 的表达量。

为了选择合适日龄及合适性别的转 hNGF 基因小鼠用于高效收集唾液并纯化 hNGF 蛋白, 文中研究了性别和日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液蛋白分泌的影响。为后续从转 hNGF 基因小鼠唾液中高效生产 hNGF 药物提供有利参考。

1 材料与方法

1.1 转基因小鼠的配种扩繁

8 周龄的 C57BL-6 品系野生型雌性小鼠购自广东省医学实验动物中心, 饲养 5 d 度过适应期后, 每只注射 7.5 IU 的 PMSG 激素 (购自宁波第二激素厂), 48 h 后每只注射 7.5 IU 的 HCG 激素 (购自宁波第二激素厂)^[21], 注射后与 10 周龄的 C57BL-6 品系的转 hNGF 基因杂合子雄性小鼠^[16]按 2:1 合笼, 次日清晨检查阴道栓, 将有栓雌鼠挑出分笼待产。

1.2 转基因小鼠的绿色荧光表达鉴定

新生小鼠在出生后第 3 日龄进行绿色荧光表达鉴定。在黑暗环境中用荧光灯 (BLS 公司, 中国) 照射小鼠, 通过滤光眼镜观察, 在荧光灯照射下发出绿色荧光的则为转基因小鼠。将转基因小鼠和野生型小鼠放在一起, 在自然光下和蓝色荧光灯照射下分别用不加滤光片和加了滤光片的相机拍摄照片。

1.3 转基因小鼠的 PCR 鉴定

小鼠在 25 日龄打耳标后剪取长度约为 5 mm 的尾巴组织置于去 DNA 酶的 1.5 mL 离心管中, 使用 Omega 公司的组织 DNA 提取试剂盒, 按照其说明书进行小鼠尾样 DNA 抽提, 抽提完成后, 用微量核酸浓度仪 (Nanodrop 2000, Thermo, 美国) 测定 DNA 样品浓度, 放于 -20 °C 冰箱保存。

用 PCR 对转基因小鼠进行基因型检测 (PCR 仪为美国 Life 公司)。hNGF 基因扩增引物为 5'-AGC TGTGGAAGCTGGTGTTCCTG-3'、5'-CAGCTTC ACGGGGAGGCTG-3', 内参基因 GAPDH 的扩增引物为 5'-CTCCCACTCTTCCACCTTCG-3'、5'-C CACCACCCTGTTGCTGTAG-3' (设计软件: Primer Premier 6.0, 由北京华大基因公司合成), 产物长度分别为 290 bp 和 110 bp。转基因小鼠 DNA 可以扩增出内参基因片段和 hNGF 基因片段, 而野生型小鼠 DNA 只能扩增出内参基因片段。PCR 试剂购自广州东盛生物科技有限公司。

1.4 小鼠唾液采集

根据日龄、性别及基因型将小鼠分成 4 组, 分别为 28 日龄转基因雄性、28 日龄转基因雌性、63 日龄转基因雄性、63 日龄转基因雌性, 每组 4 只。每只小鼠腹腔共注射氯胺酮 (剂量按每克体重 25 μ g) 和甲苯噻嗪 (剂量按每克体重 1.1 μ g) 进行麻醉^[16], 麻醉后用移液枪吸取 (每只小鼠吸取 20 min) 小鼠口腔分泌的唾液放入离心管中^[22], 放 -80 °C 冰箱保存备用。

1.5 小鼠唾液总蛋白检测

将采集好的小鼠唾液适当稀释, 使用康为世纪生物科技公司生产的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 按照其说明书对唾液中的总蛋白浓度进行测定。用酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司, 型号: Synergy H1) 在 540-590 nm 范围内测定 BSA 标准品和每个样品的吸光值, 绘制标准曲线, 计算唾液样品中的总蛋白浓度。

1.6 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测分析

将采集好的小鼠唾液适当稀释后, 使用小鼠 β -NGF ELISA 试剂盒和人 β -NGF ELISA 试剂盒 (均购自武汉尹艾博科技有限公司) 分别对转基因小鼠唾液中 mNGF 蛋白和 hNGF 蛋白浓度进行测定。用酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司, 型号: Synergy H1) 测定样品吸光值, 绘制标准曲线, 计

算唾液样品中的 mNGF 蛋白和 hNGF 蛋白浓度。

1.7 统计分析

在 Excel 表中计算出蛋白浓度及其标准差等数据,并绘制柱状图,利用 IBM SPSS Statistics 21 进行显著性分析,比较同一性别不同日龄以及相同日龄、不同性别转基因小鼠的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 转 hNGF 基因小鼠绿色荧光表达及 PCR 鉴定

荧光灯照射检测显示,转 hNGF 基因小鼠有明显荧光表达,而野生型小鼠则无荧光表达 (图 1A); PCR 检测显示,转 hNGF 基因小鼠基因组中携带 hNGF 基因,而野生型小鼠基因组中无 hNGF 基因 (图 1B)。荧光灯照射检测结果与 PCR 检测结果完全一致。

2.2 性别及日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液分泌量的影响

28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液分泌量差异不显著,且 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液分泌量也无显著差异;63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液分泌量都极显著高于 28 日龄的同一性别转 hNGF 基因小鼠 (图 2)。

2.3 性别及日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液中总蛋白分泌的影响

28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中总蛋白浓度之间差异不显著,63 日龄转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中总蛋白浓度之间差异也不显著,即同一日龄不同性别的转 hNGF 小鼠唾液中总蛋白浓度均无显著差异;63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中总蛋白浓度都极显著高于 28 日龄中同一性别的转 hNGF 基因小鼠 (图 3A)。

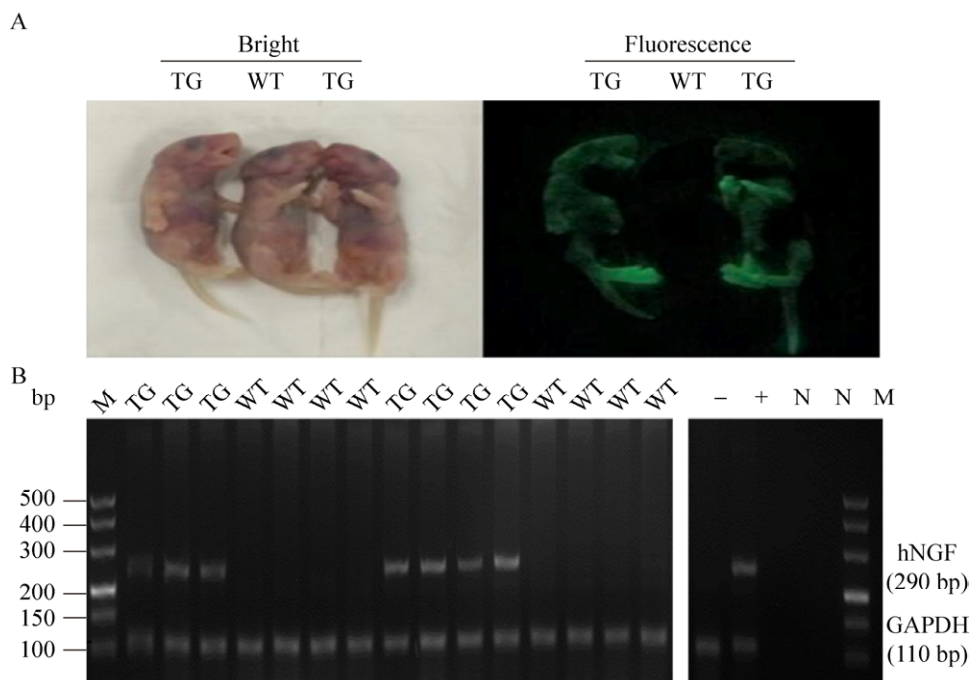


图 1 转 hNGF 基因小鼠鉴定(A: 转 hNGF 基因小鼠荧光表达鉴定; B: 转 hNGF 基因小鼠 PCR 鉴定)

Fig. 1 Identification of hNGF transgenic mice. (A) Analysis of EGFP expression in transgenic mice. (B) PCR identification of transgenic founder mice. "TG" represents transgenic mice; "WT" represents wild-type; "M" represents molecular markers; "-" represents negative control using wild-type DNA as template; "+" represents positive control using plasmid as template; N represents negative control using water as template and GAPDH was used as an internal control gene.

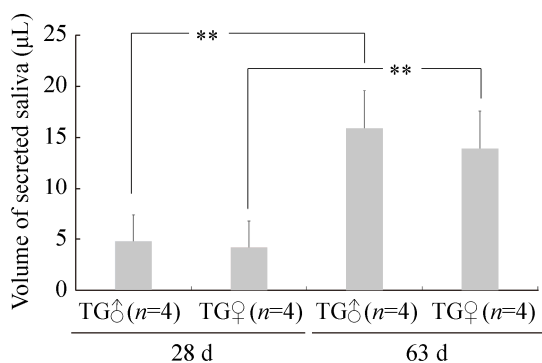


图2 性别和日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液分泌量的影响

Fig. 2 Effects of gender and age on saliva volume of hNGF transgenic mice. The amount of saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. In the same gender but different ages, the marked “***” represents the difference is extremely significant ($P<0.01$), “**” represents the difference is significant ($P<0.05$). No superscripts mean the difference is not significant ($P>0.05$).

28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中总蛋白量之间差异不显著, 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中总蛋白量之间差异也不显著, 即同一日龄的不同性别的转 hNGF 基因小鼠唾液中总蛋白量均无显著差异; 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中总蛋白量都极显著高于 28 日龄的同一性别转 hNGF 基因小鼠 (图 3B)。

2.4 性别及日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液中 mNGF 蛋白分泌的影响

转 hNGF 基因小鼠唾液中 mNGF 蛋白的分泌情况与同日龄、同性别的野生型(WT)小鼠唾液中的 mNGF 蛋白分泌情况差异均不显著 (图 4)。

28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中 mNGF 蛋白浓度差异不显著, 但 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 mNGF 蛋白浓度极显著高于 63 日龄的转 hNGF 基因雌鼠; 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 mNGF 蛋白浓度极显著高于 28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠, 但 63 日龄与 28 日龄的转 hNGF 基因雌鼠唾液中 mNGF 蛋白浓度之间差异

不显著; 不同日龄且同一性别的野生型小鼠中, 63 日龄小鼠唾液 mNGF 蛋白浓度均高于 28 日龄, 但雄性差异不显著, 而雌性差异极显著; 同一日龄不同性别的野生型小鼠中, 雄鼠唾液 mNGF 蛋白浓度均高于雌鼠, 但在 63 日龄时差异显著 (图 4A)。

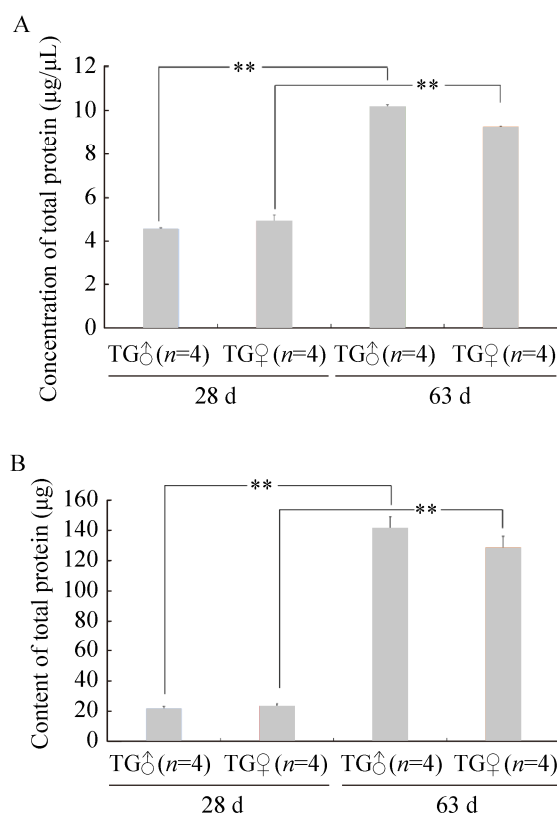


图3 性别及日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液中总蛋白分泌的影响(A: 唾液中总蛋白浓度; B: 唾液中总蛋白含量)

Fig. 3 Effects of gender and age on total protein secretion in saliva of hNGF transgenic mice. (A) Concentration of total protein in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. (B) Content of total protein in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. In the same gender but different ages, the marked “***” represents the difference is extremely significant ($P<0.01$), “**” represents the difference is significant ($P<0.05$). No superscripts mean the difference is not significant ($P>0.05$).

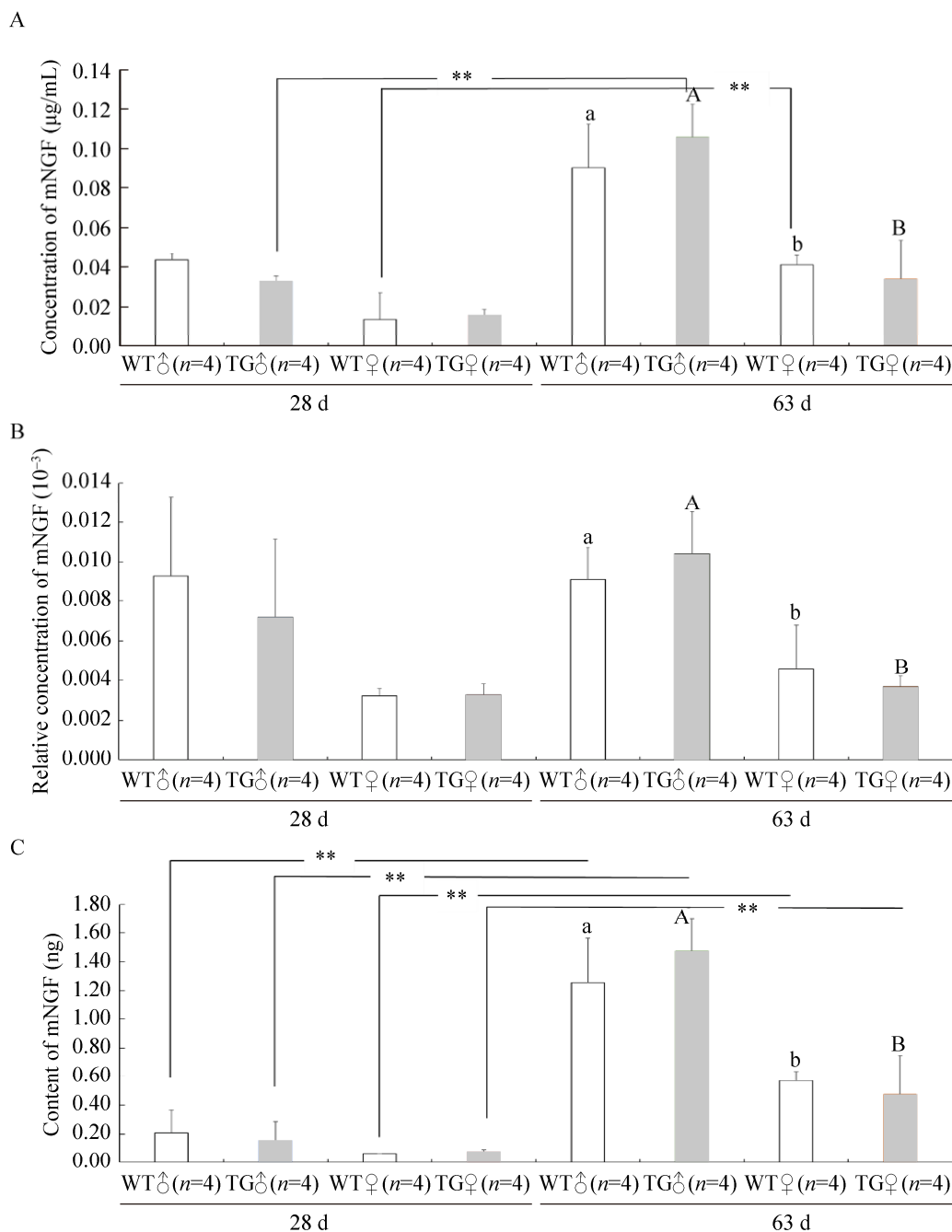


图4 性别及日龄对转hNGF基因小鼠唾液中mNGF蛋白分泌的影响(A: 转基因小鼠唾液中mNGF蛋白浓度; B: 转基因小鼠唾液中mNGF蛋白相对浓度; C: 转基因小鼠唾液中mNGF蛋白含量)

Fig. 4 Effects of gender and age on mNGF secretion in saliva of hNGF transgenic mice. (A) Concentration of mNGF in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. (B) Relative concentration of mNGF in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. (C) Content of mNGF in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. In the same gender but different ages, the marked “**” represents the difference is extremely significant ($P < 0.01$), “*” represents the difference is significant ($P < 0.05$), no superscripts mean the difference is not significant ($P > 0.05$). At the same age but different genders, if there are no superscripts, the difference is not significant ($P > 0.05$), if there are different lowercase letters in superscripts, the difference is significant ($P < 0.05$), if there are different uppercase letters in superscripts, the difference is extremely significant ($P < 0.01$).

28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中 mNGF 蛋白相对浓度无显著差异,但 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 mNGF 蛋白相对浓度极显著高于 63 日龄的转 hNGF 基因雌鼠;63 日龄与 28 日龄同一性别的转 hNGF 基因小鼠唾液中 mNGF 蛋白相对浓度差异不显著;同日龄不同性别的野生型小鼠中,雄性唾液 mNGF 相对浓度均大于雌性,但在 63 日龄差异显著;而同一性别不同日龄的野生型小鼠唾液 mNGF 蛋白相对浓度差异均不显著 (图 4B)。

28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中 mNGF 蛋白含量无显著差异,但 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 mNGF 蛋白含量极显著高于 63 日龄的转 hNGF 基因雌鼠;63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠与雌鼠唾液中 mNGF 蛋白含量极显著高于 28 日龄的同一性别转 hNGF 基因小鼠;同一日龄不同性别的野生型小鼠中,雄性唾液 mNGF 蛋白含量均高于雌性,但在 63 日龄时差异显著;同一性别不同日龄的野生型小鼠中,63 日龄小鼠唾液 mNGF 蛋白含量均极显著地高于 28 日

龄小鼠唾液 mNGF 蛋白含量 (图 4C)。

2.5 性别及日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液中 hNGF 蛋白分泌的影响

28 日龄和 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 hNGF 蛋白浓度都显著高于同一日龄的转 hNGF 基因雌鼠;63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 hNGF 蛋白浓度显著高于 28 日龄的转 hNGF 基因雄鼠;28 日龄和 63 日龄的转 hNGF 基因雌鼠唾液中 hNGF 蛋白浓度无显著差异 (图 5A)。

28 日龄和 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 hNGF 蛋白相对浓度都高于同一日龄的转 hNGF 基因雌鼠,差异显著;28 日龄与 63 日龄同一性别转 hNGF 基因小鼠唾液中 hNGF 蛋白相对浓度差异不显著 (图 5B)。

28 日龄和 63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠唾液中 hNGF 蛋白含量都高于同一日龄的转 hNGF 基因雌鼠,差异显著;63 日龄的转 hNGF 基因雄鼠和雌鼠唾液中 hNGF 蛋白含量都高于 28 日龄的同一性别的转 hNGF 基因小鼠,差异极显著 (图 5C)。

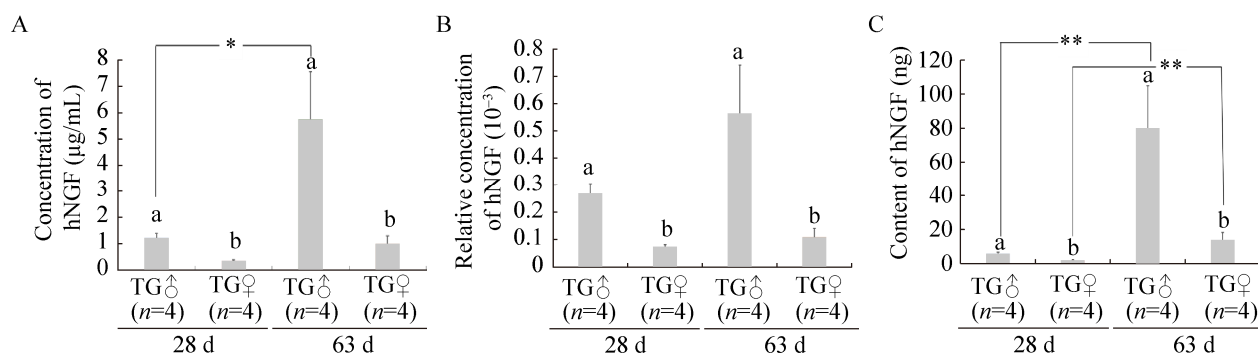


图5 性别及日龄对转 hNGF 基因小鼠唾液中 hNGF 蛋白分泌的影响 (A: 转基因小鼠唾液中 hNGF 蛋白的浓度; B: 转基因小鼠唾液中 hNGF 蛋白相对浓度; C: 转基因小鼠唾液中 hNGF 蛋白的含量)

Fig. 5 Effects of gender and age on hNGF secretion in saliva of hNGF transgenic mice. (A) Concentration of hNGF in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. (B) Relative concentration of hNGF in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. (C) Content of hNGF in saliva collected in transgenic mice within 20 min after anesthesia. In the same gender but different ages, the marked “***” represents the difference is extremely significant ($P<0.01$), “**” represents the difference is significant ($P<0.05$), no superscripts mean the difference is not significant ($P>0.05$). At the same age but different genders, if there are no superscripts, the difference is not significant ($P>0.05$), if there are different lowercase letters in superscripts, the difference is significant ($P<0.05$), if there are different uppercase letters in superscripts, the difference is extremely significant ($P<0.01$).

3 讨论

本研究结果显示,性别对转 hNGF 基因小鼠在 28 和 63 日龄分泌的唾液量、唾液总蛋白浓度、唾液总蛋白量无显著影响;对转 hNGF 基因小鼠在 63 日龄分泌的唾液 mNGF 蛋白浓度、相对浓度及总量均有显著影响,且雄性高于雌性;对转 hNGF 唾液 hNGF 蛋白浓度、相对浓度及总量都有显著影响,且雄性高于雌性。

本研究结果还显示,日龄对同一性别的转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液量、唾液总蛋白浓度、唾液总蛋白量都有显著影响,且均为 63 日龄高于 28 日龄;对雄性转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液 mNGF 蛋白浓度有显著影响,且 63 日龄高于 28 日龄;对同一性别的转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液 mNGF 蛋白总量有显著影响,且 63 日龄高于 28 日龄;对雄性转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液 hNGF 蛋白浓度有显著影响,且 63 日龄高于 28 日龄;对同一性别的转 hNGF 基因小鼠分泌的唾液 hNGF 蛋白总量有显著影响,且 63 日龄高于 28 日龄。

已有研究显示雄性小鼠唾液中 NGF 蛋白浓度显著高于雌性^[16],这与本研究结果相似。此外,还有研究显示雄性成年小鼠唾液腺中的 NGF 含量是雌性成年小鼠的 10 倍左右,而去势后的雄性成年小鼠唾液腺中的 NGF 含量则与雌性成年小鼠相当,用甲状腺激素和雄激素治疗后的去势雄性成年小鼠唾液腺中 NGF 含量分别增加 6 倍和 20 倍,且后者基本恢复至去势前的量^[23]。刘玲爱等^[24]也证明,通过注射外源雄激素可以有效提高小鼠唾液腺 NGF 的合成量。上述研究结果显示雄性激素在小鼠体内可以促进 NGF 蛋白的表达合成。这也提示我们,可以通过注射外源雄激素来提高转 hNGF 基因小鼠唾液中 hNGF 蛋白的分泌量,从而更高效生产 hNGF 蛋白。

本研究结果还显示,同一性别的转 hNGF 基因小鼠在 63 日龄分泌的唾液 mNGF 和 hNGF 蛋

白总量均显著高于 28 日龄,说明 hNGF 基因小鼠分泌的唾液 mNGF 和 hNGF 蛋白总量随日龄增加而增加,这与另一研究报道的结果一致^[20]。由于小鼠唾液蛋白的表达分泌主要受激素(例如性激素)调控,随着日龄的增加,小鼠体内的性激素含量也增加,可能就导致其唾液中 NGF 蛋白表达分泌增加^[25-26]。

根据本研究结果,如果选择 63 日龄左右(性成熟后)的雄性转 hNGF 基因小鼠采集其唾液纯化 hNGF 蛋白,与选择 28 日龄(性成熟前)的雌性转 hNGF 基因小鼠相比,hNGF 蛋白产量将提高约 46 倍。

综上所述,性别和日龄均对转 hNGF 基因小鼠唾液中的 hNGF 蛋白表达分泌量有显著影响。选择性成熟后的雄性转 hNGF 基因小鼠收集唾液纯化 hNGF 蛋白,将有利于提高该蛋白的制备效率。

REFERENCES

- [1] Bradshaw RA. Rita levi-montalcini (1909–2012). *Nature*, 2013, 493(7432): 306.
- [2] Manni L, Rocco ML, Bianchi P, et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors*, 2013, 31(4): 115–122.
- [3] Cohen S, Levi-Montalcini R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1956, 42(9): 571–574.
- [4] Weltman JK. The 1986 Nobel Prize for Physiology or Medicine awarded for discovery of growth factors: rita Levi-Montalcini, M.D., and Stanley Cohen, Ph.D. *N Engl Reg Allergy Proc*, 1987, 8(1): 47–48.
- [5] Ullrich A, Gray A, Berman C, et al. Human β -nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature*, 1983, 303(5920): 821–825.
- [6] Zhao M, Li XY, Xu CY, et al. Efficacy and safety of nerve growth factor for the treatment of neurological diseases: a meta-analysis of 64 randomized controlled trials involving 6,297 patients. *Neural Regeneration Res*, 2015(5): 819–831.
- [7] Paoletti F, Malerba F, Ercole BB, et al. A comparative analysis of the structural, functional and biological

- differences between mouse and human nerve growth factor. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854(3): 187–197.
- [8] Fujimori K, Fukuzono S, Kotomura N, et al. Overproduction of biologically-active human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(12): 1985–1990.
- [9] Negro A, Martini I, Bigon E, et al. Synthesis of the biologically active β -subunit of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Gene*, 1992, 110(2): 251–256.
- [10] Nishizawa M, Ozawa F, Higashizaki T, et al. Biologically active human and mouse nerve growth factors secreted by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 38(5): 624–630.
- [11] Barnett J, Chow J, Nguyen B, et al. Physicochemical characterization of recombinant human nerve growth factor produced in insect cells with a baculovirus vector. *J Neurochem*, 1991, 57(3): 1052–1061.
- [12] Buxser S, Vroegop S, Decker D, et al. Single-step purification and biological activity of human nerve growth factor produced from insect cells. *J Neurochem*, 1991, 56(3): 1012–1018.
- [13] Schmelzer CH, Burton LE, Chan WP, et al. Biochemical Characterization of recombinant human nerve growth factor. *J Neurochem*, 1992, 59(5): 1675–1683.
- [14] Fan BS, Lou JY. Recombinant expression of human nerve growth factor beta in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 4083–4090.
- [15] Coulibaly S, Besenfelder U, Fleischmann M, et al. Human nerve growth factor beta (hNGF- β): mammary gland specific expression and production in transgenic rabbits. *FEBS Lett*, 1999, 444(1): 111–116.
- [16] Zeng F, Li ZC, Zhu QC, et al. Production of functional human nerve growth factor from the saliva of transgenic mice by using salivary glands as bioreactors. *Sci Rep*, 2017, 7: 41270, doi: 10.1038/srep41270.
- [17] Murphy RA, Saide JD, Blanchard MH, et al. Nerve growth factor in mouse serum and saliva: role of the submandibular gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(6): 2330–2333.
- [18] Hirata Y, Orth DN. Concentrations of epidermal growth factor, nerve growth factor, and submandibular gland renin in male and female mouse tissue and fluids. *Endocrinology*, 1979, 105(6): 1382–1387.
- [19] Zhang L, Wang LF, Ding F. Gene expression of nerve growth factor in mouse uterus during postnatal development. *Acta Acad Med Nantong*, 2001, 21(4): 355–356 (in Chinese).
- 章苓, 王林芳, 丁斐. 小鼠生后发育过程中子宫 NGF 基因表达的变化. *南通医学院学报*, 2001, 21(4): 355–356.
- [20] Lu L, Ding F, Cao Z, et al. Nerve growth factor gene expression in submandibular gland of mice during postnatal development. *Acta Anatom Sin*, 1998, 29(3): 285–287 (in Chinese).
- 陆璐, 丁斐, 曹铮, 等. 生后小鼠颌下腺神经生长因子基因表达的发育变化. *解剖学报*, 1998, 29(3): 285–287.
- [21] Ding J, Tan X, Song K, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation on puberty and estrus in mice offspring. *Reproduction*, 2017, 154(4): 433–444.
- [22] Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, et al. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am J Physiol*, 1992, 263: E607–E614.
- [23] Black MA, Lefebvre FA, Pope L, et al. Thyroid hormone and androgen regulation of nerve growth factor gene expression in the mouse submandibular gland. *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 84(1/2): 145–154.
- [24] Liu LA, Liu C, Hua ZW. The effect of male sexual hormone on the synthesis of nerve growth factor in developing mouse submandibular glands. *Chin J Anatomy*, 1993, 16(2): 130–134 (in Chinese).
- 刘玲爱, 柳川, 华仲慰. 雄激素对发育中小鼠颌下腺神经生长因子合成的影响. *解剖学杂志*, 1993, 16(2): 130–134.
- [25] Walker P, Weichsel ME Jr, Hoath SB, et al. Effect of thyroxine, testosterone, and corticosterone on nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (EGF) concentrations in adult female mouse submaxillary gland: dissociation of NGF and EGF responses. *Endocrinology*, 1981, 109(2): 582–587.
- [26] Walker P. Thyroxine increases submandibular gland nerve growth factor and epidermal growth factor concentrations precociously in neonatal mice: evidence for thyroid hormone-mediated growth factor synthesis. *Pediatr Res*, 1986, 20(4): 281–284.

(本文责编 陈宏宇)