

网络出版时间:2025-08-15 15:35:22 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250815.1250.016

人胃内因子的生物信息学分析、真核表达与鉴定

范成意^{1,2}, 姜鸿彦¹, 王 波¹

(¹ 海南医科大学附属海南医院/海南省人民医院, 海口 570311;

² 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120)

摘要 **目的** 应用生物信息学方法对人胃内因子进行理化性质分析, 并对该蛋白进行真核表达与纯化。**方法** 利用蛋白质在线分析软件预测胃内因子理化性质并分析其亲水性和疏水性; 利用在线工具预测分析人胃内因子信号肽及其亚细胞定位。构建真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag, 在 HEK293F 细胞表达后经镍柱纯化获得胃内因子; 采用 SDS-PAGE、Western blot 与间接 ELISA 分别验证纯化的胃内因子纯度及活性。**结果** 胃内因子含有 417 个氨基酸, 是亲水性酸性稳定蛋白, 属于分泌蛋白且具有 Sec 原始信号肽; 成功构建 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 重组质粒, 并在 HEK293F 细胞表达系统中获得可溶性表达。**结论** 成功制得真核来源的人胃内因子, 生物信息学结果显示该蛋白为亲水酸性稳定分泌蛋白, 为后续使用该蛋白作为免疫原及蛋白校准品以构建胃内因子免疫检测方法奠定了基础。

关键词 胃内因子; 真核表达; 生物信息学; 蛋白纯化; 活性鉴定; ELISA

中图分类号 Q 786

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1485-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.017

维生素 B12 [钴胺素 (cobalamin, Cbl)] 是人体所需的特殊的微量营养元素, 是参与细胞代谢的甲基丙二酰 CoA 异构酶和蛋氨酸合酶两种酶的酶辅因子^[1], Cbl 缺乏会阻断四氢叶酸的生成进而影响 DNA 生物合成, 使人体表现为巨幼细胞性贫血, 持续而严重的 Cbl 缺乏会导致周围神经病变、认知障碍和心理变化^[2-3]。胃内因子 (gastric intrinsic factor, GIF) 是由位于胃体和胃底的壁细胞产生的糖蛋白, 具有两个活性部位, 一个活性部位用于结合 Cbl 防止其被小肠内水解酶破坏, 另一个活性部位用于回肠末端在上皮细胞膜上的 cubam 受体介导下促使 GIF-Cbl 复合物的摄取^[4]。GIF 一旦减少, 将直接导致人体不能正常吸收 Cbl 而引起恶性贫血^[5], 进而影响血液系统甚至全身发育。

正常情况下, 大部分已合成的 GIF 从胃腔分泌, 少量可能会透过胃黏膜毛细血管进入血液循环^[6], GIF 的准确测定对于胃部萎缩性病变程度的评估、恶性贫血与巨幼细胞性贫血之间的鉴别诊断具有重要的临床意义^[4, 6]。检测胃液中的 GIF 常用放射免疫法^[7], 是以钴的同位素 (⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁶⁰Co) 标记

Cbl, 通过测定放射性强度评估 GIF 与 Cbl 反应的强度从而实现 GIF 的定量 (或定性) 分析, 但该检测方法所需样本量较大, 具有放射性, 常规实验室开展难度大, 课题组试图寻求一种更简单有效的免疫检测方法来定量检测人血清中的 GIF 含量, 构建免疫检测方法需要良好的蛋白抗原作为免疫原及蛋白校准品作为研究基础, 利用真核表达蛋白抗原因增加了糖基化修饰更接近天然状态, 具有更好的免疫原性和蛋白稳定性^[8]。因此, 该研究旨在利用生物信息学方法对 GIF 的特性及功能进行预测和分析, 构建 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 重组质粒, 真核表达 GIF 蛋白并鉴定免疫活性, 旨在为后续构建 GIF 免疫检测方法奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料 JM108 感受态购自南京德泰生物公司; Hind III/Bam H I 限制性内切酶和 T4 连接酶等购自大连宝生物公司; 细胞转染试剂盒购自美国 Kyfora Bio by Polysciences 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自北京天根生物公司; 质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗购自上海碧云天生物公司; HEK293F 细胞、小鼠抗人 His tag 单克隆抗体、SDS-PAGE Marker、Western blot Marker、SDS-PAGE 预制胶、SDS-PAGE 电泳缓冲液、SDS-PAGE 上样缓冲液、ECL 试剂盒和 Ni-IDA 琼脂

2025-03-27 接收

基金项目: 海南省重大科技计划项目 (编号: ZDKJ2021040)

作者简介: 范成意, 女, 硕士研究生, 主管检验师;

王 波, 男, 教授, 通信作者, E-mail: wangqugans@163.com

糖凝胶均来源于南京德泰公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉华美生物公司;兔抗人 GIF 单克隆抗体购自美国赛默飞公司;牛血清白蛋白购自美国 Sigma-Aldrich 公司。PCR 仪购自美国 ABI 公司;核酸电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;酶标仪购自美国赛默飞公司。

1.2 方法

1.2.1 GIF 基本理化特性与亲水性和疏水性分析 利用蛋白质在线分析软件 ProtParam 和 ProtScale 分析人 GIF 的理化特性与亲水性和疏水性。

1.2.2 GIF 的信号肽预测及亚细胞定位分析 通过 SignalP6.0 在线工具预测分析 GIF 信号肽和使用 PSORT II server 工具对亚细胞定位进行分析。

1.2.3 human GIF 真核表达载体的构建 登陆 GenBank 获取 human GIF 参考序列(登录号: P27352),利用 DNA 合成仪全基因合成法获得目的 DNA。基因合成由南京德泰公司完成。将合成后的目的基因(含 Kozak 序列、信号肽序列和 C 端 His tag 序列)质粒与真核表达载体 pcDNA3.1(+)分别通过 Hind III/Bam H I 进行酶切。酶切体系配置完成后充分混匀瞬离,37 ℃ 酶切 1 h。酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,并利用胶回收试剂盒进行目的片段的回收,在 T4 DNA 连接酶的作用下,将 human GIF 与真核表达载体 pcDNA3.1(+)相连,将连接产物转化于 JM108 感受态中,选取阳性克隆扩大培养,小提质粒经双酶切验证同时送测序。

1.2.4 human GIF-His tag 转染、蛋白表达与纯化 将测序成功的 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 质粒按照 Kyfora Bio by Polysciences 公司细胞转染试剂盒的使用说明转染入 HEK293F 细胞中。在转染 4~6 d 后将培养细胞悬液离心并收集上清液,经 0.22 μm 滤器过滤后在 4 ℃ 下 pH7.40,1 × PBS 缓冲液中透析。收集纯化过程中的上样液、流穿液和不同浓度咪唑(100 mmol/L 和 500 mmol/L)下的洗脱液进行 SDS-PAGE,经考马斯亮蓝染液染色后凝胶成像,以检测蛋白纯化效果。收集浓度和纯度较高的蛋白,装入截留分子量 10 ku 的透析膜于预冷的 1 × PBS, pH7.40 缓冲液中透析 3~4 次,每次至少 4 h 以去除纯化残留的咪唑,透析结束后用 0.22 μm 滤器过滤,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,根据标准曲线计算出目的蛋白浓度。

1.2.5 Western blot 法检测 GIF 的表达 取纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 PVDF 膜,5% (w/v) 脱脂奶粉封闭 2 h 后,1 : 5 000 稀释小鼠

抗 His tag 单克隆抗体后室温孵育 1 h, TBST 充分洗涤。1 : 1 000 稀释 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗后室温孵育 1 h, TBST 充分洗涤;再加入 1 : 1 000 稀释的 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗,室温振荡孵育 1 h;加入 ECL 显色液避光显色 2 min,化学发光显影检测 GIF 的表达。

1.2.6 间接 ELISA 检测 GIF 的免疫活性 用包被液稀释已纯化的 GIF 抗原至一定浓度后包被酶标板,阴性对照组用牛血清白蛋白包被,空白对照组用 PBS 包被。用 3% BSA 封闭 2 h,加入 1 : 10 000 稀释的兔抗 GIF 单克隆抗体,置于 37 ℃ 孵育 1 h,用 PBST 洗涤 5 次,3 min/次,末次倒扣酶标板拍干板孔液体。于板孔中加入 1 : 20 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗,37 ℃ 孵育 30 min,洗涤拍干后加入显色液避光显色,酶标仪测定 $A_{450\text{ nm}}$ 值。

1.3 统计学处理 用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行统计作图和分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,采用独立样本 t 检验比较两组数据差异,单因素方差分析比较多组数据差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GIF 基本理化特性与亲水性和疏水性 预先分析预测 GIF 的理化性质有助于后续蛋白表达与纯化鉴定工作的展开。使用 ProtParam 工具分析 GIF 的理化性质。GIF 由 417 个氨基酸组成,分子式为 C2023H3208N524O619S20,分子量为 45 ku,原子总数为 6 394 个,各氨基酸组成见表 1,在 GIF 中,亮氨酸(Leu)和丝氨酸(Ser)的比例最高,而组氨酸(His)的比例最低。GIF 带有 28 个正电荷残基和 32 个负电荷残基,亲水指数 -0.037,脂肪指数 92.16,不稳定指数 34.60,理论等电点为 5.80,估计半衰期为 30 h。当蛋白不稳定指数小于 40、亲水指数小于 0、理论等电点小于 7 时,初步认为 GIF 为亲水酸性稳定蛋白。进一步分析 GIF 的亲水性和疏水性,在第 241 位氨基酸处存在最小疏水点为 -2.578,而在第 343 位氨基酸处存在最大疏水点为 2.444, GIF 的亲水性氨基酸残基数量多于疏水性氨基酸,因此认为 GIF 整体上是亲水性的。见图 1。

2.2 GIF 的信号肽预测及亚细胞定位分析 通过对 GIF 进行信号肽分析,发现其具有 Sec 信号肽(Sec/SPI)且原始信号肽位于 1~17 位氨基酸,氨基酸序列为 MAWFALYLLSLLWATAG,信号肽剪切位点位于第 17 和 18 位氨基酸之间,其疏水性较强,能

表1 GIF 氨基酸组成情况

Tab.1 Analysis of amino acid composition of gastric intrinsic factor by ProtParam

Amino acid	Quantity	Ratio(%)
Ala(A)	32	7.7
Arg(R)	6	1.4
Asn(N)	31	7.4
Asp(D)	12	2.9
Cys(C)	6	1.4
Gln(Q)	20	4.8
Glu(E)	20	4.8
Gly(G)	23	5.5
His(H)	5	1.2
Ile(I)	27	6.5
Leu(L)	44	10.6
Lys(K)	22	5.3
Met(M)	14	3.4
Phe(F)	12	2.9
Pro(P)	25	6.0
Ser(S)	41	9.8
Thr(T)	32	7.7
Trp(W)	6	1.4
Tyr(Y)	13	3.1
Val(V)	26	6.2

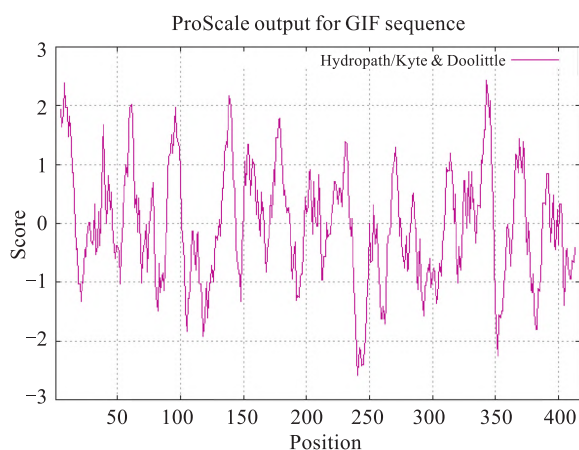


图1 GIF 的亲水性和疏水性分析结果

Fig. 1 Hydrophilic and hydrophobicity analysis of gastric intrinsic factor

促进重组蛋白分泌,见图2。因此,在后续载体构建过程中保留本段信号肽以增加分泌蛋白的表达量。使用 PSORT II server 工具对亚细胞定位进行分析,结果显示,GIF 主要分布于细胞外,概率占比为66.7%,分布于细胞核与线粒体的概率分别为22.2%、11.1%。研究表明,GIF 主要为胞外分泌蛋白。

2.3 重组质粒 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 的鉴定 将 human GIF-His DNA 片段与载体 pcDNA3.1(+)利用 T4 DNA 连接酶相连接,转化至

JM108 大肠埃希菌扩增提取质粒,通过 Hind III/Bam HI 双酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果显示,在约 1 284 bp 和 5 410 bp 处分别出现了特异性条带,条带完整清晰,且大小与预期设计相符,表明实验成功地扩增出目标片段,其纯度较高且无明显的非特异性扩增现象,见图3。序列比对结果证实,测序结果与参考序列一致,表明成功构建了 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 重组质粒。

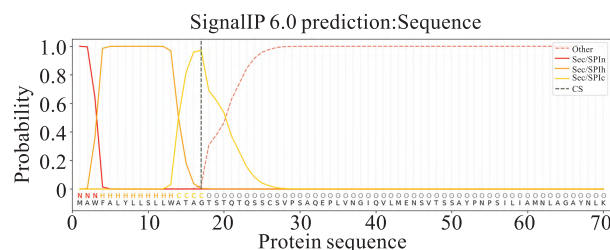


图2 GIF 的信号肽分析预测结果

Fig. 2 Predictions from signal peptide analysis of gastric intrinsic factor

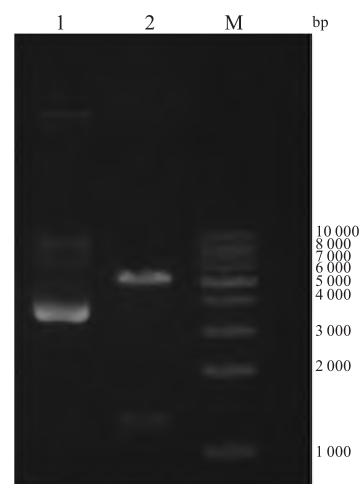


图3 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 重组质粒及双酶切产物电泳

Fig.3 The electrophoresis of recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag and double enzyme digestion products

1: plasmid DNA; 2: double enzyme digestion products; M: DNA Marker.

2.4 GIF 表达与纯化 将重组质粒 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 转染 HEK293F 细胞后培养 5 d,收集细胞上清液用 0.22 μm 无菌滤器过滤与 1 $\times$ PBS 透析后,经过镍柱纯化得到含量为 1.09 mg/mL 的 GIF。SDS-PAGE 分析分子量在 50 ku 与 65 ku 之间有单一清晰的蛋白条带表达,与预测分子量大小相符。见图4。

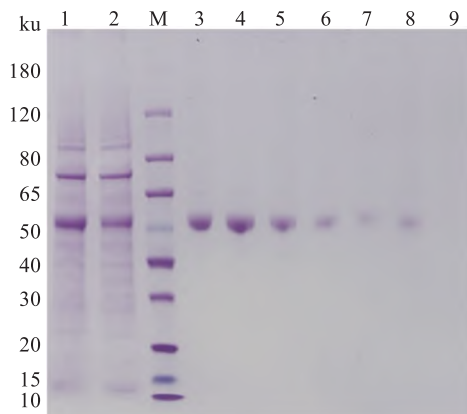


图4 转染后细胞上清液及洗脱产物 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of transfected cell supernatant and elution product

1: Supernatant after centrifugation; 2: Supernatant flow-through solution after incubation with Ni-IDA; 3-7: 100 mmol/L imidazole elution component; 8-9: 500 mmol/L imidazole elution component; M: SDS-PAGE protein marker.

2.5 Western blot 和间接 ELISA 鉴定 GIF 通过小鼠抗 His 标签单克隆抗体对纯化的 GIF 进行 Western blot 分析,在 50 ~ 65 ku 之间观察到特异性条带,见图 5,与 GIF 蛋白的预期分子量相符;另外,利用兔抗人 GIF 单克隆抗体进行间接 ELISA,显示 GIF 组的 A_{450nm} 值显著高于阴性对照组 ($P < 0.0001$),见图 6。表明纯化的 GIF 蛋白具有免疫活性,能够与兔抗人 GIF 单克隆抗体发生特异性结合。以上两种实验表明,本次纯化的目标蛋白就是 human GIF。

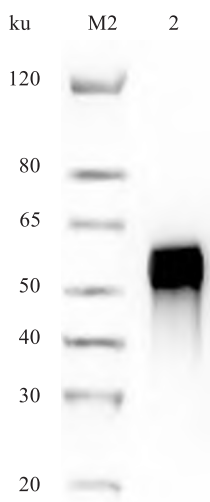


图5 Western blot 鉴定纯化 GIF

Fig. 5 Western blot identification of purified gastric intrinsic factor
2: GIF protein (0.56 μ g); M2: Western blot marker.

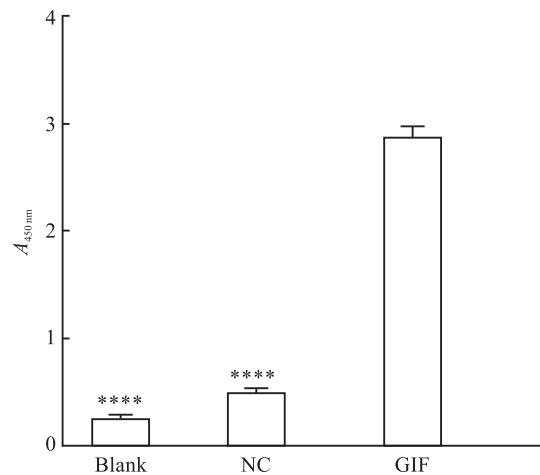


图6 间接 ELISA 检测 GIF

Fig. 6 Gastric intrinsic factor was detected by indirect ELISA

**** $P < 0.0001$ vs GIF group.

3 讨论

GIF 在人体健康中发挥着关键作用,膳食摄入的维生素 B12 首先在胃部酸性条件下与触角蛋白结合,随后十二指肠胰蛋白酶降解触角蛋白,通过 GIF 吸收维生素 B12。GIF 的缺失会导致维生素 B12 的吸收障碍进而引起恶性贫血,持续而严重的 GIF 缺乏甚至会引发神经精神系统异常^[3-4]。原核表达产物在人源蛋白方面仍面临诸多挑战。以大肠埃希菌为例,其在发酵过程中往往会生成内毒素,这对蛋白的纯化和应用构成了限制。原核表达产物不稳定易降解,缺少翻译后修饰,免疫原性差^[9-10]。真核表达产物更接近天然状态,翻译后的蛋白增加了糖基化修饰,免疫原性良好且抗体维持时间长,同时具有良好的蛋白稳定性。尽管真菌、昆虫和植物细胞等真核表达系统有糖基化修饰,但其聚糖结构与人类明显不同^[11],HEK293F 细胞因其蛋白表达水平更高且细胞操作简易而受到越来越多的青睐^[12-14]。

基于此,课题组成功构建了 pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag 重组质粒,并利用 HEK293F 细胞的真核表达从细胞上清液中纯化获得了毫克级别的人 GIF (1.09 mg/mL);通过 SDS-PAGE 分析发现 GIF 在 HEK293F 细胞中正确表达且纯化的 GIF 展现了较高的纯度,与董贵彬等^[15]在谷氨酸棒杆菌中表达出的原核重组 GIF (浓度为 47.15 μ g/mL) 相比,采用 HEK293F 细胞真核表达系统所得到的 GIF 在浓度和纯度上均表现出显著优势,对于后续研究及

应用具有较大潜力。细胞上清表达纯化的重组 GIF 分子量在 50 ~ 65 ku 间,高于使用在线蛋白质软件分析氨基酸序列的分子量 45 ku,推测与 HEK293F 真核细胞表达增加了糖基化修饰有关,能更大程度上接近天然的糖基化修饰。通过间接 ELISA 方法鉴定兔抗人 GIF 单克隆抗体与 GIF 的作用,具有免疫活性。在后续研究中,课题组将使用该蛋白作为免疫原及真核重组 GIF 校准品构建 GIF 免疫检测方法,为进一步实现与维生素 B12、抗 GIF 抗体等检测指标联合应用于临床体检筛查与疾病诊断及鉴别诊断提供新的思路与策略。

参考文献

- [1] Green R, Allen L H, Bjørke-Monsen A L, et al. Vitamin B12 deficiency[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17040. doi:10.1038/nrdp.2017.40.
- [2] Green R, Miller J W. Chapter Fifteen - Vitamin B12 deficiency [M]//LITWACK G. *Vitamins and hormones*, Academic Press, 2022; 405 - 39.
- [3] Langan R C, Goodbred A J. Vitamin B12 deficiency: recognition and management[J]. *Am Fam Physician*, 2017, 96(6): 384 - 9.
- [4] Al-Awami H M, Raja A, Soos M P. Physiology, gastric intrinsic factor [Internet]. In: *StatPearls - NCBI Bookshelf*, 2023, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.
- [5] Esposito G, Dottori L, Pivetta G, et al. Pernicious Anemia: the hematological presentation of a multifaceted disorder caused by cobalamin deficiency[J]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1672. doi:10.3390/nu14081672.
- [6] Greibe E, Nexø E. Development of a sensitive ELISA for gastric intrinsic factor and detection of intrinsic factor immunoreactivity in human serum[J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 4043. doi:10.3390/nu14194043.
- [7] Marcoullis G, Rothenberg S P. Functional activity of intrinsic factor measured by using solubilized receptor protein [J]. *Clin Chem*, 1982, 28(8): 1794 - 6.
- [8] 蒋励萍, 陈露颖, 蒯佳婕, 等. 人源 GRK2 的真核表达、纯化及活性检测[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(2): 179 - 84. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.001.
- [8] Jiang L P, Chen L Y, Kuai J J, et al. Eukaryotic expression, purification and activity identification of human His-GRK2 recombinant protein[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(2): 179 - 84. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.001.
- [9] Naseri N, Miran M, Mofid M R. Expression of recombinant insulin-like growth factor-binding protein-3 receptor in mammalian cell line and prokaryotic (*Escherichia coli*) expression systems[J]. *Adv Biomed Res*, 2022, 11: 19. doi:10.4103/abr.abr_197_20.
- [10] Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production[J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1158 - 70. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.022.
- [11] O'Flaherty R, Bergin A, Flampouri E, et al. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: a review of the critical steps in their biomanufacturing[J]. *Biotechnol Adv*, 2020, 43: 107552. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107552.
- [12] Portolano N, Watson P J, Fairall L, et al. Recombinant protein expression for structural biology in HEK 293F suspension cells: a novel and accessible approach [J]. *J Vis Exp*, 2014 (92): e51897. doi:10.3791/51897.
- [13] Chowdhury A, Brinson R, Wei B, et al. Tissue inhibitor of metalloprotease-2 (TIMP-2): bioprocess development, physicochemical, biochemical, and biological characterization of highly expressed recombinant protein[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(49): 6423 - 33. doi:10.1021/acs.biochem.7b00700.
- [14] Faravelli S, Campioni M, Palamini M, et al. Optimized recombinant production of secreted proteins using human embryonic kidney (HEK293) cells grown in suspension[J]. *Bio Protoc*, 2021, 11(8): e3998. doi:10.21769/BioProtoc.3998.
- [15] 董贵彬, 潘颖越, 司雅楠, 等. 人胃内因子在谷氨酸棒杆菌中的表达及活性研究[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(2): 5 - 9. doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2020.02.005.
- [15] Dong G B, Pan Y Y, Si Y N, et al. Expression and optimization of recombinant human gastric factors in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *J Biol*, 2020, 37(2): 5 - 9. doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2020.02.005.

Bioinformatics analysis, eukaryotic expression and identification of human gastric intrinsic factor

Fan Chengyi^{1,2}, Jiang Hongyan¹, Wang Bo¹

(¹Hainan Affiliated Hospital of Hainan Medical University/Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311;

²Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120)

Abstract Objective To analyze the physical and chemical properties of human gastric factor by bioinformatics method, and to express and purify the protein. **Methods** Protein online analysis software was used to predict the physical and chemical properties of gastric intrinsic factor and analyze their hydrophilicity and hydrophobicity. The online tool was used to predict and analyze the human gastric factor signal peptide and its subcellular location. The

网络出版时间:2025-08-15 15:24:49 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20250815.1250.018

本维莫德调控 NRF2/ROS/NLRP3 通路减轻特应性皮炎

陆 芸^{1,2},董丽萍^{1,2},黄茂欣^{1,2},王 宇^{1,2},邓婷月^{1,2},肖风丽^{1,2,3}

(¹ 安徽医科大学第一附属医院皮肤科,合肥 230022;² 安徽医科大学皮肤病研究所

皮肤病学教育部重点实验室,合肥 230032;³ 炎症免疫疾病安徽省实验室,合肥 230032)

摘要 **目的** 探讨本维莫德(BVM)治疗特应性皮炎(AD)的作用机制。**方法** 利用 TNF- α 和 IFN- γ 刺激 HaCaT 细胞,将细胞分为 NC 组、TNF- α /IFN- γ 组、TNF- α /IFN- γ /BVM 组、TNF- α /IFN- γ /BVM/ML385 组;DNCB 诱导 Balb/c 小鼠的 AD 模型,动物分为 CON 组、DNCB 组、DNCB + BVM 组、DNCB + 他克莫司(TAC)组,评估 BVM 效果,及其在抗氧化及焦亡调节中的作用。**结果** 与对照组相比,BVM 抑制了 TNF- α 和 IFN- γ 刺激的 HaCaT 细胞炎症反应,改善了 DNCB 诱导的 AD 小鼠模型皮损和炎症;同时,使核因子 E2 相关因子 2(NRF2)相关抗氧化应激蛋白表达显著增加,细胞活性氧(ROS)水平及焦亡蛋白表达显著降低。**结论** BVM 可通过激活 NRF2/ROS/NLRP3 通路抑制焦亡,从而减轻 AD 中的炎症反应。

关键词 本维莫德;特应性皮炎;焦亡;NLRP3;NRF2;ROS

中图分类号 R 758.23

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1490-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.018

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是常见的慢性炎症性皮肤病,已有研究^[1]表明焦亡与 AD 的发病存在密切关系。焦亡通常由炎症小体 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3, NLRP3)触发并由 Gasdermin 蛋白家族成员执行,导致细胞内容物的释

放^[2]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)被认为是 NLRP3 炎症小体激活的关键介质之一^[3]。炎症小体的激活和随后的焦亡导致促炎细胞因子释放,放大皮肤中的炎症反应并导致 AD 的发生发展^[4]。本维莫德(benvitimod, BVM)是一种小分子治疗药物,可激活核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, NRF2)通路,参与 ROS 的细胞防御^[5]。目前尚不清楚 BVM 是否能通过抑制 ROS 的生成干扰焦亡而减轻 AD。该研究通过细胞和动物实验探索 BVM 的抗氧化应激及抑制焦亡的作用。结果表明 BVM 可激活 NRF2/ROS/NLRP3 通路,抑制焦亡,从而减轻 AD 中的炎症反应。该研究为治

2025-02-14 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82373481);安徽省高校自然科学基金重点项目(编号:2023AH053302)

作者简介:陆 芸,女,硕士研究生;

肖风丽,女,博士,教授,主任医师,博士生导师,通信作者,

E-mail: xiaofengli@126.com

eukaryotic expression recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag was constructed, and the gastric intrinsic factor was purified by nickel column after expression in HEK293F cells. The purity and activity of purified gastric intrinsic factor were verified by SDS-PAGE, Western blot and indirect ELISA. **Results** Gastric factor contained 417 amino acids and was a hydrophilic acid stable protein. It was a secreted protein with Sec original signal peptide. pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag recombinant plasmid was successfully constructed and soluble expression was obtained in HEK293F cell expression system. **Conclusion** The eukaryotic source of human gastric intrinsic factor is successfully prepared, and the bioinformatics results show that the protein is a hydrophilic acid stable secreted protein, laying a foundation for the subsequent use of this protein as an immunogen and protein calibrator to construct an immunoassay for gastric factor.

Key words gastric intrinsic factor; eukaryotic expression; bioinformatics; protein purification; activity identification; ELISA

Fund program Major Science and Technology Program of Hainan Province (No. ZDKJ2021040)

Corresponding author Wang Bo, E-mail: wangqugans@163.com