

DOI:CNKI:61-1390/S.20110711.1717.007

网络出版时间:2011-07-11 17:17:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110711.1717.007.html>

小鼠 SOCS3 基因真核表达载体的构建及其对 3T3-L1 细胞凋亡的影响

安磊^a, 孙婵^b, 解芸菲^a, 王勇^b, 吕彬^b, 孙超^b

(西北农林科技大学 a 动物医学院, b 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】探讨 SOCS3 对 3T3-L1 细胞凋亡的影响。【方法】以小鼠脂肪组织提取的 RNA 为模板, 用 RT-PCR 扩增 SOCS3 基因, 将其克隆至 pMD18-T Simple, 构建 pMD18-T-SOCS3 重组质粒, 经测序验证后, 以 pMD18-T-SOCS3 为模板扩增 SOCS3 基因, 将其克隆至 pEGFP-N1, 构建真核重组质粒 pEGFP-N1-SOCS3, 测序正确后, 将重组质粒 pEGFP-N1-SOCS3 转染 3T3-L1 细胞, 荧光下观察 GFP 的表达, RT-PCR 和 Western blotting 检测细胞内 SOCS3 mRNA 和蛋白的表达, 观察细胞凋亡的变化。【结果】测序表明, pMD18-T-SOCS3 和 pEGFP-N1-SOCS3 的核苷酸序列正确率为 100%; 在荧光显微镜下发现, 脂质体组和 SOCS3 组均有 GFP 的表达; RT-PCR 和 Western blotting 检测表明, 3T3-L1 细胞中 SOCS3 mRNA 表达显著提高 ($P < 0.05$); Hoechst 33258 染色发现, SOCS3 组的细胞凋亡显著; *Bax* 和 *c-myc* 基因的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), *bcl-2* 和 *mcl-1* 基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。【结论】SOCS3 对脂肪细胞凋亡的发生有促进作用。

【关键词】 细胞凋亡; SOCS3; pEGFP-N1

【中图分类号】 Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)09-0017-07

Construction of mice SOCS3 eukaryotic vector and its effects on 3T3-L1 cells apoptosis

AN Lei^a, SUN Chan^b, XIE Yun-fei^a, WANG Yong^b, LV Bin^b, SUN Chao^b

(a College of Veterinary Medicine, b College of Animal Science and Technology,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The research is aimed at discussing the effects of SOCS3 on 3T3-L1 Lipoapoptosis. 【Method】With RNA extracted from mice adipose tissue as a template, SOCS3 was amplified to pMD18-T by RT-PCR and recombinant plasmid pMD18-T-SOCS3 was constructed. After sequencing, SOCS3 was amplified to pEGFP-N1 with pMD18-T-SOCS3 as a template and the eukaryotic recombinant plasmid pEGFP-N1-SOCS3 was constructed, after sequencing the pEGFP-N1-SOCS3. GFP under the fluorescence microscope is expressed and the expressions of SOCS3 mRNA and protein by RT-PCR and Western blotting was used to detect the change of apoptosis. 【Result】The recombinant plasmid pMD18-T-SOCS3 and pEGFP-N1-SOCS3 are qualified to be right by sequence identification in genbank; Lipofectamine group and SOCS3 group show that GFP is expressed under the fluorescence microscopy; SOCS3 mRNA and protein in the cells detected by RT-PCR and Western blotting express significantly ($P < 0.05$).

* [收稿日期] 2011-02-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30871785); 教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-06-0865)

[作者简介] 安磊(1984—), 男, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: anlei1344@163.com

[通信作者] 孙超(1968—), 男, 陕西商南人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事生物技术与遗传研究。

E-mail: sunchao2775@163.com

The apoptosis of SOCS3 group increased significant after Hoechst 33258 staining; Compared with the control group, SOCS3 group significantly increased apoptosis, the mRNA expression level of *Bax* and *c-myc* gene was significantly increased ($P < 0.05$), while *bcl-2* and *mcl-1* was significantly decreased ($P < 0.05$).

【Conclusion】SOCS3 can promote fat cell apoptosis.

Key words: apoptosis; SOCS3; pEGFP-N1

细胞信号转导抑制因子(suppressors of cytokine signaling, SOCS)被认为是 JAK/STAT 信号通路的负反馈调节因子^[1]。其中 SOCS3 可与细胞因子受体相结合,抑制 JAKs 激酶的活性,进而抑制 STAT 3 的磷酸化^[2]。SOCS3 也可参与负调控生长激素(GH)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等细胞因子的信号转导^[3]。因此,研究 SOCS3 对细胞凋亡机制不仅可阐明 SOCS 的生物学意义,而且可为新药研发提供思路。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程。Gavathiotis 等^[4]发现了一种可以激活蛋白质 Bax 的物质,从而促进细胞凋亡。凋亡抑制蛋白 bcl-2 是膜的整合蛋白,其能控制线粒体中细胞色素 c (Cytc) 等凋亡因子的释放。Gong 等^[5]探讨了神经肽 Y-Y5 受体的反义基因功能,结果证明脂肪组织基因组 DNA 提取物显现出凋亡梯状条带,并检测到凋亡相关基因 *bcl-2* 表达下调, *Bax* 表达上调。 *c-myc* 在凋亡细胞中也是高表达,作为转录调控因子,其一方面能激活控制细胞增殖的基因,另一方面也激活促进细胞凋亡的基因,给细胞 2 种选择,即增殖或凋亡。在细胞凋亡、周期、分化及生存中 *mcl-1* 有重要的调节作用。 *mcl-1* 与 *bcl-2* 具有相似的序列和功能,均可促进细胞存活,其在细胞凋亡途径中具有独特作用。Nijhawan 等^[6]发现, *mcl-1* 的快速表达和降解,表明其在细胞凋亡调控中具有重要作用。本研究从小鼠脂肪组织中克隆 SOCS3 基因,导入 pEGFP-N1,构建真核表达载体并转染 3T3-L1 细胞,检测凋亡相关基因的表达量,探讨小鼠 SOCS3 基因对 3T3-L1 细胞凋亡的影响,以期为进一步研究 SOCS3 在脂肪细胞凋亡信号通路中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物、细胞株与菌种 SPF 级昆系健康小鼠,购自第四军医大学,取样前用体积分数 0.5% 的新洁尔灭清洗; 3T3-L1 细胞、pEGFP-N1 和 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细菌,均为本实验室保存。

1.1.2 工具酶和其他试剂 质粒抽提试剂盒,购自 Omega 公司; DNA 凝胶快速回收试剂盒,购自 Bio

Flux 公司; RNAiso Plus、内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶和 pMD18-T Simple,购自 TaKaRa 公司; LipofectamineTM 2000,购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清,购自杭州四季清生物工程有限公司; 胰蛋白酶、HEPES,购自 Merck 公司; Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit,购自 Fermentas 公司; Opti-MEM 细胞培养基,购自 Gibco 公司; DL2000 和 *Taq* DNA 聚合酶,购自天根生化公司; SOCS3 鼠源性单克隆抗体,购自美国 Millipore 公司; 羊抗鼠二抗,购自北京博奥森公司; Hoechst 33258 凋亡染色试剂盒,购自南京凯基公司。其他试剂均为国产或进口分析纯,引物合成及 DNA 测序由金斯瑞生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脂肪组织 SOCS3 基因的扩增 根据 NCBI 中公布的小鼠 SOCS3 基因序列,使用 Primer 5.0 软件设计 1 对特异性引物,扩增片段长度为 678 bp,覆盖 SOCS3 基因完整的编码区域,上游引物 SOCS3-F: 5'-ATGGTACCCACAGCAAG-3'; 下游引物 SOCS3-R: 5'-TCAAGTGGAGCATCATACTG-3'。提取小鼠脂肪组织的 RNA, RT-PCR 得到 cDNA,以 cDNA 为模板经 PCR 得到 SOCS3 基因片段,电泳后回收目的片段。PCR 反应参数: 5 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 52.5 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

1.2.2 重组质粒的构建与鉴定 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测,并用 DNA 凝胶快速回收试剂盒回收目的片段,将回收产物与 pMD18-T Simple 载体连接,并转化 DH5 α ,挑取阳性克隆、摇菌。采用菌液 PCR 鉴定后,命名为 pMD18-T-SOCS3,阳性重组质粒送至金斯瑞生物技术有限公司测序。

根据 NCBI 中公布小鼠 SOCS3 基因序列,设计 1 对特异性引物,覆盖 SOCS3 基因完整的编码区域,上游引物 SOCS3-F: 5'-AACAAGCTTATGGTCACCCACAGCAAG-3'; 下游引物 SOCS3-R: 5'-CCGGATCCTCAAGTGGAGCATCATACTG-3',扩增长度 678 bp,在上、下游引物的 5'端分别引入内切酶 *Hind* III 与 *Bam*H I 的识别序列(下划线部

分),并加入保护碱基。以 pMD18-T-SOCS3 为模板 PCR 扩增得到 SOCS3 片段,将回收的 SOCS3 基因片段和质粒 pEGFP-N1 用内切酶 *Hind* III 与 *Bam*H I 进行双酶切后,电泳并回收片段。回收产物在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 ℃ 连接过夜,经氯化钙法转化入 *E. coli* DH5 α ,挑取单克隆摇菌,提取质粒,经 *Hind* III 与 *Bam*H I 双酶切和 PCR 鉴定后,将获得的阳性克隆质粒(命名为 pEGFP-N1-SOCS3)进行测序。利用 NCBI 的 BLAST 比对将测序结果与 GenBank 中公布的小鼠 SOCS3 基因序列进行比较。

1.2.3 细胞培养及转染 将 3T3-L1 细胞接种于含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养液(含 100 IU/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素)中,在 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 条件下培养,2~3 d 换液 1 次。转染试验分为空白对照组、脂质体组(转染空质粒)和 SOCS3 组(转染重组质粒)3 组,按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行。

1.2.4 转染重组质粒的 3T3-L1 细胞 GFP 表达的观察 将 3T3-L1 细胞传代至 6 孔细胞培养板中,

在 2 mL 无双抗培养基中培养 24 h,至细胞铺满皿底约 90%时进行转染。转染 24~36 h 后在显微镜下观察细胞内 GFP 的表达情况。

1.2.5 3T3-L1 细胞中 SOCS3 mRNA 和蛋白表达的检测 用重组质粒转染 3T3-L1 细胞 24 h 后提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测 SOCS3 基因的表达情况,感染 48 h 后提取细胞的总蛋白,Western blotting 检测 SOCS3 蛋白的表达情况。

1.2.6 Hoechst 33258 染色 染色步骤按照 Hoechst 33258 凋亡染色试剂盒说明书进行。凋亡细胞对 Hoechst 33258 的摄取增多,染色体浓缩,染色呈蓝色荧光,而正常细胞只有微弱荧光,死细胞则不被染色。

1.2.7 凋亡相关基因的表达 采用 Primer 5.0 软件分别设计相关基因引物(各基因及引物序列见表 1)。用 pEGFP-N1-SOCS3 转染 3T3-L1 细胞 24 h 后提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测凋亡相关基因 *Bax*、*c-myc*、*bcl-2* 和 *mcl-1* 的表达,以 β -actin 为内参。

表 1 各基因引物序列及退火温度
Table 1 Sequence of gene primers and Annealing temperature

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	扩增片段长度/bp Size	退火温度/℃ Annealing temperature
SOCS3	F:ATGGTCACCACAGCAAGTT R:CTGTCGCGATAAGAAAGGT	218	58
<i>mcl-1</i>	F:GGAAGAGGACGACCTATACCGC R:CCACAAAGGCACCGAAAGAA	317	59
<i>c-myc</i>	F:CAAGGGAAGACGATGACGG R:TTGAGCGGTAGGGAAAGA	355	57
<i>bcl-2</i>	F:CCCCTGGCATCTTCTCCTT R:ACATCTCCCTGTTGACGCTCT	446	58
<i>Bax</i>	F:AGGATGCGTCCACCAAGAA R:CAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC	195	55
β -actin	F:ACTGCCGCATCCTCTTCCTC R:CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	399	54

2 结果与分析

2.1 β -actin 及 SOCS3 扩增产物的鉴定

从图 1 可见,扩增获得了大小为 399 bp 的 β -ac-

tin 条带,说明反转录良好,可以扩增目的基因 SOCS3。以 RT-PCR 得到的 cDNA 为模板,PCR 扩增 SOCS3 的产物为单一条带,大小为 678 bp(图 1)。

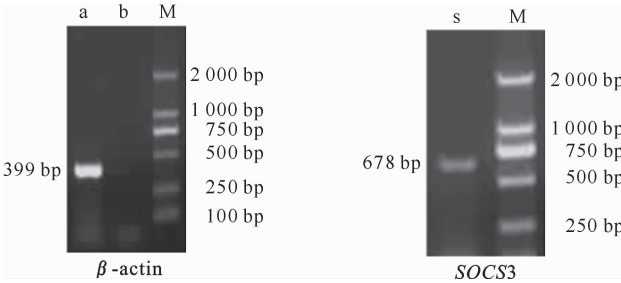


图 1 β -actin 和 SOCS3 PCR 产物电泳结果
a. β -actin PCR 产物;b. 空白对照;s. SOCS3 PCR 产物;M. DNA Marker

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of β -actin and SOCS3

a. PCR product of clones of β -actin;b. PCR product of empty,as control;s. PCR product of SOCS3;M. DNA Marker

2.2 重组质粒的鉴定

分别以 pMD18-T-SOCS3 和 pEGFP-N1-SOCS3 为模板进行 PCR 扩增,所得产物大小为 678 bp(图 2A、B)。pEGFP-N1-SOCS3 经 *Hind* III 与 *Bam*H I 双酶切电泳后可见 3 个条带,2 条大片段为切开的

pEGFP-N1,大小约为 5.5 和 4.5 kb,小片段为 SOCS3,大小为 678 bp(图 2C)。对回收的重组质粒进行序列测定,将其与 NCBI 中公布的小鼠 SOCS3 基因序列 (GenBank Accession No. NM_007707.3) 进行比较分析,核苷酸序列正确率为 100%。

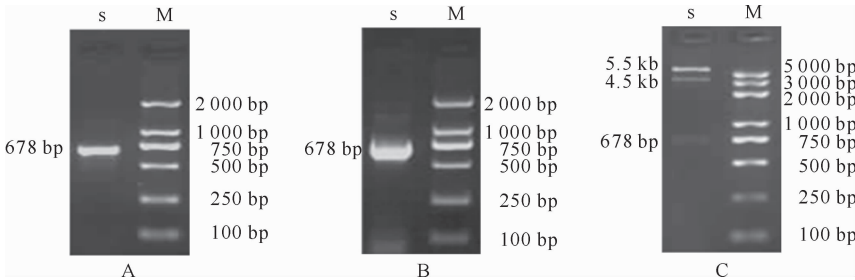


图 2 SOCS3 的克隆鉴定

A. pMD18-T-SOCS3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析;B. pEGFP-N1-SOCS3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析;
C. pEGFP-N1-SOCS3 的双酶切鉴定;s. SOCS3 的 PCR 产物;M. DNA Marker

Fig.2 Clone and identification of SOCS3

A. PCR production of pMD18-T-SOCS3 were analyzed by agarose gel electrophoresis;
B. PCR production of pEGFP-N1-SOCS3 were analyzed by agarose gel electrophoresis;
C. Identification of pEGFP-N1-SOCS3 restriction enzyme digestion;s. PCR production of SOCS3;M. DNA Marker

2.3 重组质粒 pEGFP-N1-SOCS3 转染 3T3-L1 细胞 GFP 表达的观察

细胞 24 h 后,荧光显微镜观察发现,正常培养的 3T3-L1 细胞无 GFP 表达,而脂质体组和 SOCS3 组均有 GFP 表达(图 3),证明转染成功。

重组质粒 pEGFP-N1-SOCS3 转染 3T3-L1 细

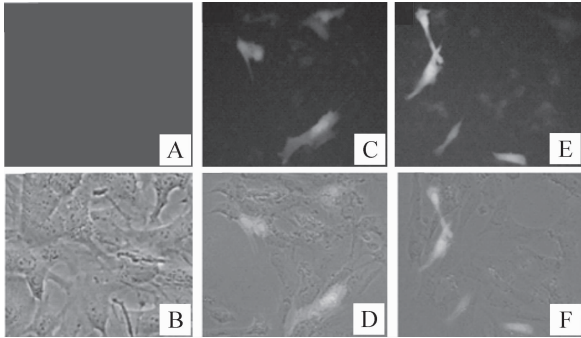


图 3 重组质粒 pEGFP-N1-SOCS3 转染 3T3-L1 细胞的显微观察

A、B. 空白对照组;C、D. 脂质体组;E、F. SOCS3 组

Fig.3 Observation of 3T3-L1 cells transfected by pEGFP-N1-SOCS3

A,B. Control group;C,D. Liposome group;E,F. SOCS3 group

2.4 转染 3T3-L1 细胞中 SOCS3 mRNA 和蛋白表达的检测

将 pEGFP-N1-SOCS3 转染 3T3-L1 细胞 24 h 后,提取细胞总 RNA 并进行 RT-PCR,检测靶基因 mRNA 的表达情况,结果见图 4A、C。于感染 48 h 后提取细胞的总蛋白,Western blotting 检测 SOCS3 蛋白的表达情况,结果见图 4B。由图 4 可知,转染 pEGFP-N1-SOCS3 的 3T3-L1 细胞中

SOCS3 的表达显著高于未转染的细胞 ($P<0.05$)。

2.5 SOCS3 对 3T3-L1 细胞凋亡的影响

通过 Hoechst 33258 染色发现,与空白对照组(图 5A)和脂质体组(图 5B)相比,SOCS3 组(图 5C)与 Hoechst 33258 结合增强,染色呈强蓝色荧光,细胞凋亡数量明显增多;正常细胞的胞核呈圆形或椭圆形,染色均一;而凋亡细胞的胞核浓缩,染色质凝集。

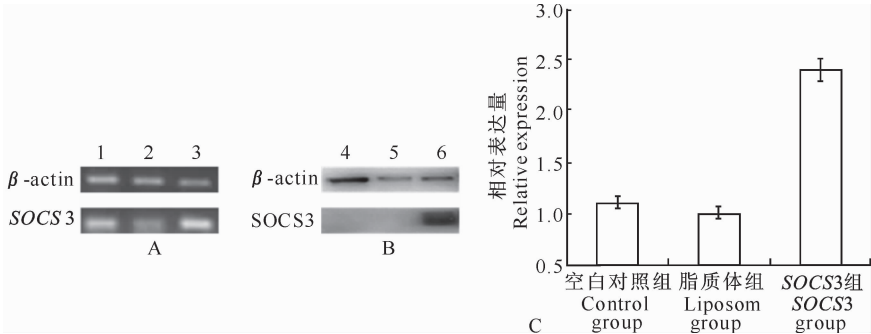


图 4 转染 3T3-L1 细胞中 *SOCS3* mRNA 和蛋白的表达

1~3. 分别为空白对照组、脂质体组、*SOCS3* 组 β -actin 和 *SOCS3* 基因的表达产物；
4~6. 分别为空白对照组、脂质体组、*SOCS3* 组 β -actin 和 *SOCS3* 蛋白的表达产物；
* 表示与空白对照组差异显著 ($P < 0.05$), # 表示与脂质体组差异显著 ($P < 0.05$). 图 6 和 7 同
Fig. 4 *SOCS3* mRNA and protein expression in adipocytes cells
1-3. β -actin and *SOCS3* expression in control group, liposome group, *SOCS3* group, respectively;
4-6. β -actin and *SOCS3* protein expression in control group, liposome group, *SOCS3* group, respectively;
* represents the significant difference between the control group and *SOCS3* group ($P < 0.05$),
represents the significant difference between the liposome and *SOCS3* group ($P < 0.05$). Fig. 6, 7 are the same

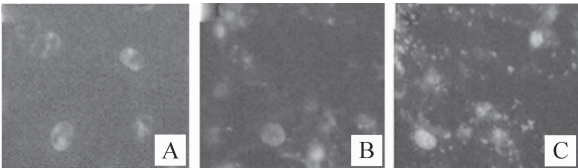


图 5 *SOCS3* 对 3T3-L1 细胞凋亡的显微观察

A. 空白对照组; B. 脂质体组; C. *SOCS3* 组
Fig. 5 Influence of *SOCS3* on 3T3-L1 adipocytes apoptotic
A. Control group; B. Liposome group; C. *SOCS3* group

2.6 凋亡相关基因的表达

用 pEGFP-N1-*SOCS3* 转染 3T3-L1 细胞 24 h 后提取细胞总 RNA, RT-PCR 检测凋亡相关基因 *Bax*、*c-myc*、*bcl-2* 和 *mcl-1* 的表达, 以 β -actin 为内

参, 结果见图 6 和 7。由图 6 可知, *SOCS3* 组 *Bax* 和 *c-myc* 的表达显著高于空白对照组和脂质体组 ($P < 0.05$)。由图 7 可知, *SOCS3* 组 *bcl-2*、*mcl-1* 的表达显著低于空白对照组和脂质体组 ($P < 0.05$)。

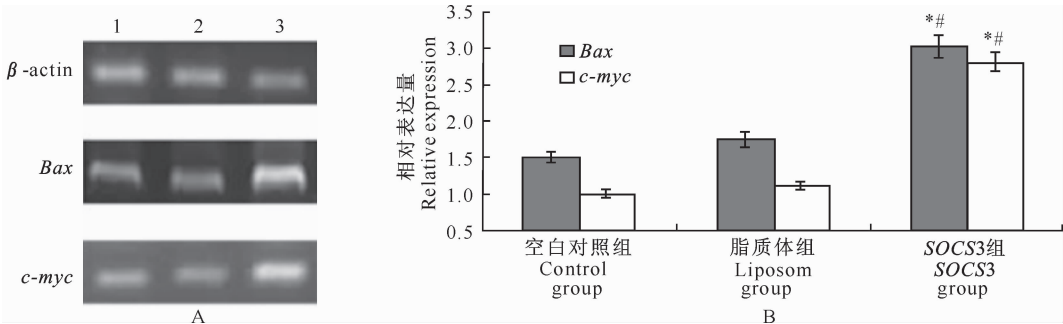


图 6 *SOCS3* 对 *Bax* mRNA 和 *c-myc* mRNA 表达的影响

1~3. 分别为空白对照组、脂质体组、*SOCS3* 组
Fig. 6 The effect of *SOCS3* on *Bax* mRNA and *c-myc* mRNA expression
1-3. Control group, liposome group, *SOCS3* group, respectively

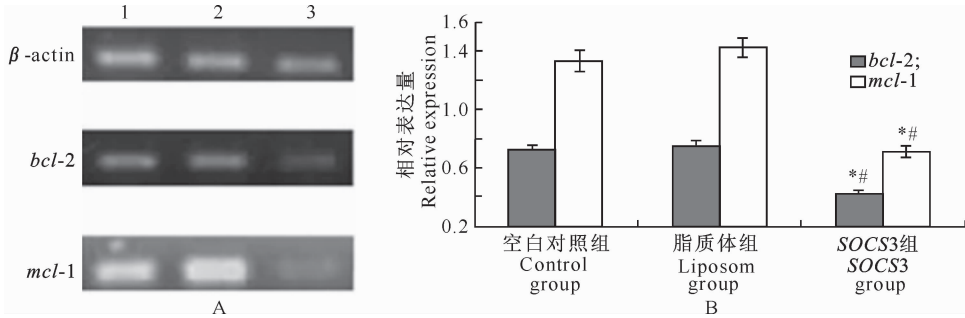


图 7 SOCS3 对 *bcl-2* mRNA 和 *mcl-1* mRNA 表达的影响

1~3. 分别为空白对照组、脂质体组、SOCS3 组

Fig. 7 The effection of SOCS3 on *bcl-2* mRNA and *mcl-1* mRNA expression

1—3. Control group, liposome group, SOCS3 group, respectively

3 讨 论

细胞凋亡是调节生物体正常发育和生命活动的一种不可缺少的机制,凋亡细胞的吞噬和降解是整个细胞凋亡程序的必要环节。通过自我吞噬途径,有助于解释细胞凋亡在人类疾病如癌症、阿尔茨海默症和帕金森症中的作用。自我吞噬还能细胞提供在非凋亡时的一种替代形式的自我毁灭^[7]。国内也有人采用针刺治疗单纯性肥胖大鼠的方法,促进脂肪细胞凋亡^[8]。迄今为止,尚不清楚 SOCS3 和脂肪细胞凋亡之间的相互作用机制。

bcl-2 家族成员都含有 1~4 个 *bcl-2* 同源结构域(BH1—BH4),并且通常有 1 个羧端跨膜结构域(transmembrane region, TM)。其中 BH4 是抗凋亡蛋白所特有的结构域,BH3 是与促进凋亡有关的结构域。根据功能和结构可将 *bcl-2* 基因家族分为 2 类,一类是抗凋亡基因,如 *bcl-2*、*bcl-xl*、*bcl-w*、*mcl-1*,有学者认为 *mcl-1* 可能是直接或间接的调节 *Bax*^[9],*mcl-1* 下调能诱导细胞凋亡^[10],在细胞凋亡中 *mcl-1* 能与促凋亡蛋白 Bim 结合,并使其与线粒体外膜分离^[11];研究发现,过表达的 *Bax* 能与 *mcl-1* 结合,而正常细胞胞浆中的 *Bax* 没有被激活,不能结合其他蛋白,线粒体膜上的 *Bax* 也不能与 *mcl-1* 结合^[12]。另一类是促凋亡基因,如 *Bax*、*Bak*、*Bad*、*Bid*、*Bim*,其中 *Bid*、*Bad* 在促凋亡蛋白中仅含 BH3 结构。虽然 *bcl-2* 蛋白存在于线粒体膜、内质网膜以及外核膜上,但其主要定位于线粒体外膜,拮抗促凋亡蛋白。而大多数促凋亡蛋白则主要定位于细胞质,一旦细胞受到凋亡因子的诱导,其可以向线粒体转位,通过寡聚化在线粒体外膜形成跨膜通道,或者开启线粒体的 PT 孔,从而导致线粒体中凋亡因子的释放,激活 caspase,最终导致细胞凋亡。

He 等^[13] 研究发现,在肺癌细胞中恢复 SOCS3 表达可阻碍 STAT3 的磷酸化,并抑制肿瘤生长,SOCS3 也可通过抑制 STAT3 磷酸化及其下游效应因子的表达从而诱导细胞凋亡。SOCS3 负调控 JAK 活化和 STAT 磷酸化,可能使病毒逃避宿主的免疫反应。研究发现,SOCS3 盒的缺失并不依赖 STAT 的磷酸化而是与 JAK 相关^[14]。Rezende 等^[15] 则通过 JAK-STAT-SOCS3 途径抑制大鼠胰岛细胞凋亡试验证明,在众多的细胞信号网络中,JAK-STAT 负调控机制与凋亡信号通路的发生存在一定的联系。

本研究构建了真核表达载体并成功转染 3T3-L1 细胞,结果显示,凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *mcl-1* 在转染重组质粒后,其 mRNA 表达量明显下调。张巧琳等^[16] 发现,抑制 *c-myc* 可促进 *bcl-2* 表达。在凋亡信号网络中,SOCS3 基因与其他调节基因及信号分子之间的相互作用尚有待深入研究。本研究成功构建了 SOCS3 基因的重组真核载体,并对脂肪细胞凋亡进行了初步研究,结果证明 SOCS3 对 3T3-L1 脂肪细胞凋亡具有促进作用,为深入研究 SOCS3 对细胞凋亡信号通路的影响奠定了基础。

[参考文献]

[1] Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor [J]. Nature, 1997, 387 (6636): 924-929.

[2] Yoshimura A, Nishinakamura H, Matsumura Y, et al. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): 100-110.

[3] Ronn S G, Hansen J A, Lindberg K, et al. The effect of suppressor of cytokine signaling 3 on GH signaling in β -cells [J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(9): 2124-2134.

[4] Gavathiotis E, Suzuki M, Davis M L, et al. Bax activation is initiated at a novel interaction site [J]. Nature, 2008 455(7216):

1076-1081.

[5] Gong H X,Guo X R,Fei L,et al. Lipolysis and apoptosis of adipocytes induced by neuropeptide Y-Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides in obese rats [J]. Acta Pharmacologica Sin,2003,24(6):569-575.

[6] Nijhawan D,Fang M,Traer E,et al. Elimination of mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation [J]. Genes Dev,2003,17(12):1475-1486.

[7] Deborah L,Berryand Eric H,Baehreckel. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in drosophila [J]. Cell,2007,131(6):1137-1148.

[8] 高建芝,李新娟,李娜娜,等. 针刺对单纯性肥胖大鼠脂肪组织中 bcl-2 的表达及脂肪细胞凋亡的影响 [J]. 新乡医学院学报,2009,28(2):437-440.

Gao J Z,Li X J,Li N N,et al. Influence of acupuncture on the expression of bcl-2 and adipocyte apoptosis in simple obesity rats [J]. Journal of Xixiang Medical College,2009,28(2):437-440. (in Chinese)

[9] Zhang B,Gojo I,Fenton R G,et al. Myeliod cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma [J]. Blood,2002,99(6):1885-1893.

[10] Willis S N,Chen L,Dewson G,et al. Proapop totic Bak is sequestered by mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins [J]. Genes Dev,2005,19(11):1294-1305.

[11] Han J,Goldstein L A,Gastman B R,et al. Degradation of mcl-1 by granzyme B:Implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events [J]. J Biol Chem,2004,279(21):22020-22029.

[12] Clohessy J G,Zhuang J,de Boer J,et al. mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome crelease and its role in receptor-mediated apoptosis [J]. J Biol Chem,2006,281(9):5750-5759.

[13] He B,You L,Uematsu K,et al. SOCS3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer [J]. Proc Natl Acad Sci,2003,100(24):14133-14138.

[14] Boyle K,Zhang J G,Nicholson S E,et al. Deletion of the SOCS box of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in embryonic stem cells reveals SOCS box-dependent regulation of JAK but not STAT phosphorylation [J]. Cellular Signalling,2009,21(3):394-404.

[15] Rezende L F,Vieira A S,Negro A,et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis [J]. Cytokine,2009,46(1):65-71.

[16] 张巧琳,徐新,刘琪,等. c-Myc 小分子抑制剂 10058-F4 对肾癌 786-0 细胞增殖凋亡的影响 [J]. 重庆医学,2010,39(22):3049-3050.

Zhang Q L,Xu X,Liu Q,et al. Effect of small molecule c-Myc inhibitor 10058-F4 on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma 786-0 cells [J]. Chongqing Medicine,2010,39(22):3049-3050. (in Chinese)

(上接第 16 页)

[8] 王淑芳,周银涛. 微生态制剂在断奶仔肉兔饲料中应用效果研究 [J]. 当代畜牧,2008(5):31-33.

Wang S F,Zhou Y T. Efficacy of probiotics in weaned rabbit's forage [J]. Contemporary Animal Husbandry,2008(5):31-33. (in Chinese)

[9] 张旭,魏仲珊,李华丽. 双歧杆菌的分离鉴定与耐氧驯化 [J]. 现代食品科技,2009,25(1):31-34.

Zhang X,Wei Z S,Li H L. Isolation, identification and acclimatization of a resistant-oxygen strain of bifidobacteria [J]. Modern Food Science and Technology,2009,25(1):31-34. (in Chinese)

[10] 黄沧海,谯仕彦,李德发,等. 益生乳酸杆菌抑制大肠杆菌的研究 [J]. 中国畜牧杂志,2003,39(6):27-28.

Huang C H,Diao S Y,Li D F. Studies on lactobacilli inhibiting *E. coli* [J]. Chinese Journal of Animal Science,2003,39(6):27-28. (in Chinese)

[11] 陈莉南. 双歧杆菌的生理功效及应用研究进展 [J]. 科技创新导报,2010(11):2-3.

Chen X N. Bifidobacterium physiology functions and research progress [J]. Science and Technology Innovation Herald,2010(11):2-3. (in Chinese)

[12] 朱俊晨,李世民,魏小青. 双歧杆菌对人体的生理作用及研究进展 [J]. 中国微生态学杂志,2000,12(1):53-55.

Zhu J C,Li S M,Wei X Q. Bifidobacterium on human physiological function and research progress [J]. Chinese Journal of Microecology,2000,12(1):53-55. (in Chinese)

[13] 牛钟相,朱瑞良. 兔双歧杆菌的生物拮抗与药敏试验 [J]. 中国预防兽医学报,1996,86(1):55-56.

Niu Z X,Zhu R L. Biological antagonism and bacterial susceptibility tests on rabbit bifidobacterium [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,1996,86(1):55-56. (in Chinese)