

大鼠补体 C5a 蛋白真核、原核表达载体的构建以及体外表达的鉴定、纯化和生物学活性分析

季明德^{1,2}, 单 锴¹, 庞蓉蓉¹, 赵 聃¹, 王迎伟^{1*}

(¹南京医科大学微生物与免疫学系, 江苏 南京 210029; ²江苏省中医院检验科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建带 His 标签的大鼠补体 C5a 蛋白真核表达载体 pIRES2-EGFP-C5a 和原核表达载体 pET-21a-C5a, 分别观察其体外表达情况, 将 C5a 蛋白纯化后分析其生物学活性。方法: 以 RT-PCR 方法从大鼠肝细胞中扩增出大鼠补体 C5a 基因全长 cDNA 序列, 在序列的 N 端添加 6 个组氨酸 His 标签后, 插入含增强绿色荧光蛋白的真核表达质粒 pIRES2-EGFP, 用脂质体法转染 HEK293 细胞, 免疫印迹法检测 C5a 蛋白的表达水平; 以真核表达质粒 pIRES2-EGFP-C5a 为基础, 将大鼠补体 C5a 基因亚克隆至原核表达载体 pET-21a, 体外检测 C5a 蛋白的表达情况, 之后再行 Ni²⁺螯合亲和层析柱纯化 C5a 蛋白。以 C5a 刺激中性粒细胞, 流式细胞仪检测细胞内活性氧的生成; C5a 刺激大鼠肾小球系膜细胞(GMC)不同时间, RT-PCR 测定其产生 IL-6 和 TNF- α 的水平。结果: RT-PCR 扩增出了大鼠补体 C5a 基因; 并成功构建了 pIRES2-EGFP-C5a 重组质粒, 体外成功转染入 HEK293 细胞, 并在荧光显微镜下可见强绿色荧光蛋白的表达, 但免疫印迹法未能检出 C5a 蛋白的表达; 另成功构建了 pET-21a-C5a 原核表达载体, 并在体外用免疫印迹法检测到了 C5a 蛋白表达。另用亲和层析纯化得到了带 His 标签的 C5a 蛋白, 证实 C5a 能促进中性粒细胞呼吸氧爆发。结论: 成功构建了大鼠补体 C5a 真核和原核表达载体。构建的原核表达载体可测到 C5a 蛋白的表达, 且 C5a 蛋白具有相应的生物学活性。

[关键词] 补体 C5a; 质粒构建; 真核表达; 原核表达; 生物学活性

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1344-07

doi:10.7655/NYDXBNS20131003

Construction, identification, purification and biological activity of eukaryotic and prokaryotic expression vector of rat complement C5a

Ji Mingde^{1,2}, Shan Kai¹, Pang Rongrong¹, Zhao Dan¹, Wang Yingwei^{1*}

(¹Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Medical Laboratory, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct eukaryotic expression vector pIRES2-EGFP-C5a, prokaryotic expression vector pET-21a-C5a of rat complement C5a containing histidine tag, and observe its expression and biological activity *in vitro*. **Methods:** Total RNA was isolated from rat liver cells, C5a gene was amplified by reverse transcriptional PCR and inserted into pIRES2-EGFP vector. After lipofectamine-mediated transfection of HEK293 cells with pIRES2-EGFP plasmid, the expression of rat C5a protein was determined by fluorescence microscope and Western blot. The prokaryotic expression vector of pET-21a-C5a was constructed, and the expression of C5a protein was determined by Western blot. Rat C5a was purified by Ni²⁺ chelating affinity chromatography column. The reactive oxidative species (ROS) generated from neutrophils which were stimulated by C5a was detected by flow analyzer. The mRNA of IL-6 and TNF- α was detected after rat GMCs were stimulated by C5a for different time. **Results:** The rat complement C5a gene was amplified by reverse transcriptional PCR successfully. The pIRES2-EGFP-C5a plasmid was successfully constructed and transfected into HEK293 cells. The expression of green fluorescent protein was seen under by fluorescence microscopy, but no C5a was detected. Meantime, the pET-21a-C5a plasmid was also constructed, and the expression of C5a could be detected using Western blot. And the histidine tagged C5a protein was purified by Ni²⁺ chelating affinity chromatography column. C5a can stimulate the neutrophils to generate ROS. **Conclusion:** The pIRES2-EGFP-C5a plasmid and pET-21a-C5a

[基金项目] 国家自然科学基金(81072402;8127333)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangyw1508@njmu.edu.cn

plasmid were successfully constructed, and the expression of C5a in prokaryotic expression vector pET-21a-C5a could be detected and the product was biological active.

[Key words] C5a; plasmid construction; eukaryotic expression; prokaryotic expression; biological activity

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1344-1350]

补体成分 C5 蛋白含有 1 676 个氨基酸, 相对分子质量为 188 000, 其编码基因位于 9 号染色体长臂 32~34 区^[1]。大鼠的 C5a 是包含 77 个氨基酸的糖蛋白, 是由 C5 转化酶切除 C5 的 α 链释放而来, 是天然免疫反应中不可缺少的一部分, 并在适应性免疫中扮演着重要角色, 位于 C5a 羧基端的具有 4 个残基的结合槽可促使 C5a 与 C5a 受体(C5aR)结合, 激活 C5aR 发挥相应的作用^[2-3]。

C5a 具有很强的过敏毒素功效, 可不依赖于肥大细胞释放组胺, 增加血管的通透性, 刺激平滑肌收缩。高浓度的 C5a 是中性粒细胞、嗜酸粒细胞和单核细胞的趋化剂^[4], 可诱导这些细胞移动。此外, C5a 还能刺激中性粒细胞黏附, 并增强其产生超氧化物的能力。C5a 对免疫应答也有明显增强作用, 如诱导分泌细胞因子等^[5]。C5a 与相应的 C5a 受体结合后可参与多种疾病的病理过程, 如急性肺损伤^[6]、脓毒血症^[7]、顺铂引起的肾小球肾炎^[8]、动脉粥样硬化^[9]和肿瘤^[10]等。C5a 受体除了表达于嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核巨噬细胞、肥大细胞外, 还表达于上皮细胞、神经元细胞、星型胶质细胞、小胶质细胞以及一些来源于肾、肺、肝、脾、肠、皮肤和心脏的细胞^[2]。

人类系膜增生性肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN) 是一种严重危害人类健康且与免疫相关的肾小球炎性疾病, 大鼠 Thy-1 肾炎是一种公认的研究人类 MsPGN 的动物模型。Thy-1 肾炎的发病机制是注射的 Thy-1 抗体可与肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cell, GMC) 表面的 Thy-1 抗原结合, 形成免疫复合物后继发激活补体的经典途径, 最终引起组织损伤。在此过程中, 除了产生 C5b-9 复合物外, 还能产生 C3a、C5a 等裂解片段。本课题组前期实验已经证实, 大鼠 GMC 表面存在 C5aR。然而, Thy-1 肾炎发病后补体 C5a 将起着怎样的致病作用, 目前尚不清楚, 值得进一步研究。鉴于目前国内外市场上尚无大鼠 C5a 蛋白供应, 为能得到有生物学活性的 C5a 蛋白, 本文拟利用分子生物学技术制备并纯化大鼠的 C5a 蛋白, 同时对其部分生物学活性进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞和质粒

大肠杆菌 DH5 α (北京全式金公司); HEK293 细胞株 (武汉大学中国典型培养物保藏中心)、pIRES2-EGFP 质粒 (上海研拓生物科技有限公司)、pET-21a 质粒 (上海北诺生物科技有限公司)。

1.1.2 主要试剂

TRIzol (Invitrogen 公司, 美国); 反转录试剂盒 (Fermentas 公司, 美国); 真核细胞转染试剂 (南京慧基公司); PyrobestTaqDNA Polymerase (北京全式金公司)、T4 DNA ligase 及限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I (NEB 公司, 美国); 凝胶回收和质粒提取试剂盒 (Axygen 公司, 美国); 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG, Sigma 公司, 美国); 兔抗 His 多克隆抗体 (Origene 公司, 美国); 羊抗 actin 多克隆抗体 (武汉博士德公司); Ni²⁺螯合亲和层析柱 (南京金斯特公司); 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA, Sigma 公司, 美国); 引物合成、DNA 序列测定由上海英骏公司完成。

1.1.3 动物

SD 大鼠, 清洁级, 雌雄不限, 体重 250~300 g (南京医科大学动物实验中心)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HEK293 细胞在含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 于 5% CO₂ 孵箱中 37℃ 培养。

1.2.2 质粒构建

1.2.2.1 RT-PCR 扩增 C5a 基因编码序列全长

利用 TRIzol 从大鼠肝脏中提取总 RNA, 反转录合成 cDNA (方法见试剂盒说明书)。根据 GenBank 中报道的 C5a 基因 cDNA 序列的开放阅读框架, 用 Primer5.0 软件设计出上、下游引物, 在上游引物中设计了 *EcoR* I 酶切位点和 6 个组氨酸标签, 在下游引物中设计了 *Bam*H I 酶切位点, 由 Invitrogen 公司合成引物, 上游引物: 5'-CGGAATTCGGATGC

ATCATCATCATCATCATGACCTGCAGCTCCTGC-3'; 下游引物:5'-CGGGATCCCCTTACCTTCCCAACAGC ATGCCTTG-3'。然后利用 C5a 基因特异性引物,用梯度 PCR 仪扩增 C5a 编码基因 cDNA 全长。

1.2.2.2 PCR 产物的纯化

PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,切取含 250 bp 左右的目的片段凝胶,用凝胶回收纯化试剂盒回收。

1.2.2.3 pIRES2-EGFP-C5a 真核表达载体的构建

将含空质粒 pIRES2-EGFP 的菌液扩增后按照质粒提取流程提取质粒。PCR 产物与 pIRES2-EGFP 质粒用 *EcoR* I、*Bam*H I 进行双酶切,回收纯化,连接后,转化大肠杆菌 DH5 α 。取转化产物涂布含卡那霉素平板,置 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 16 h,挑取单克隆菌落,37 $^{\circ}$ C 摇菌 14 h,收集菌液测序。

1.2.3 质粒转染及蛋白提取

转染前 1 d 接种合适密度的 HEK293 细胞,于 5% CO₂ 孵箱中,37 $^{\circ}$ C 培养约 24 h。在 60 mm 培养皿中接种 1×10^6 个细胞,分别转染 pIRES2-EGFP 空载和 pIRES2-EGFP-C5a 质粒,48 h 后收集细胞加入 60 μ l 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白。

1.2.4 pET-21a-C5a 原核表达载体构建及蛋白提取

将含有目的基因的质粒 pIRES2-EGFP-C5a 采用双酶切的方法亚克隆至原核表达载体 pET-21a,将 pET-21a 空质粒及 pET-21a-C5a 质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,37 $^{\circ}$ C 培养约 14 h 后再加入 3 倍体积培养液继续培养 1.5 h,加入 IPTG 后培养 6 h,收集菌液,加入细菌裂解液后超声裂菌,12 000 r/min 离心收获蛋白。

1.2.5 Western blot 检测真核及原核 C5a 蛋白表达

取 80 μ g 蛋白经 18% SDS-PAGE 凝胶分离,5% 脱脂奶粉封闭 3 h, TBST 洗膜 15 min (3 次)。加入兔抗 His 抗体 (1:500),4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (1:5 000) 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜后行 ECL 显色。

1.2.6 带 His 标签 C5a 蛋白的纯化及鉴定

C5a 蛋白用缓冲液进行稀释后,按照 Ni²⁺亲和层析柱使用说明书进行层析纯化,收集纯化产物 10 ml,置于 3 kD 超滤管,3 900 g 离心 30 min,浓缩并脱盐、脱咪唑处理,收获终产物 1.5 ml,再行 Western blot 鉴定。

1.2.7 C5a 刺激中性粒细胞(PMN)诱导呼吸爆发的测定

1.2.7.1 大鼠 PMN 的分离

参照 Haslett 法^[11]:取 SD 大鼠,雌雄不限,乙醚麻醉眼眶取血,获取 16 ml 肝素钠抗凝血液,经 1 500 r/min 水平离心 5 min 后,取红细胞上的白膜层,用含 2% 胎牛血清的 PBS 稀释为富含 PMN 细胞悬液,继在玻璃离心试管中,依次加入 75%、60% Percoll 液和富含 PMN 细胞悬液(三者体积比为 2:2:1),然后以 2 000 r/min 水平离心 20 min,吸取 60% 与 75% Percoll 液的界面层中 PMN。用含 2% 胎牛血清的 PBS 充分洗脱 Percoll 胶粒,用低渗法将残余的红细胞裂解,再用前述 PBS 调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml。

1.2.7.2 PMN 内活性氧(ROS)检测

取经 Percoll 分离后的 PMN 与终浓度 10 μ mol/L DCFH-DA 相混,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中避光负载 30 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清,用纯化并超滤过的 C5a 500 μ l 重悬细胞,37 $^{\circ}$ C 水浴箱温育 5 min 后,用流式细胞仪检测 PMN 产生的 ROS(同时设置空白对照与阴性对照)。用空白对照管在 FSC 和 SSC 二维点阵图选取 PMN 区域,用 Cell Quest 软件分析散点图中 PMN 的活化率。PMN 活化率 = DCFH 阳性 PMN 细胞/总 PMN 细胞 \times 100%,每个样品收集 1×10^4 个细胞。Cell Quest 软件分析平均荧光强度(MFI)。

1.2.8 C5a 刺激大鼠 GMC 诱导 IL-6 和 TNF- α 基因表达的检测

用 C5a 刺激 GMC,提取刺激后不同时间段(0、30 min、1、2、4、8 h)的 GMC 总 RNA,反转录合成 cDNA。根据 GenBank 中报道的 IL-6 和 TNF- α 基因 cDNA 序列,用 Primer 5.0 软件设计出上、下游引物,由 Invitrogen 公司合成,IL-6 上游引物:5'-CCAGTTGCCTTCTTGGGACTGATG-3';下游引物:5'-ATTTTCTGACCACAGTGAGGAATG-3';TNF- α 上游引物:5'-ATGAGCACGGAAAGCATGATCCGA-3';下游引物:5'-CCAAAGTAGACCTGCCCCGACTC-3'。RT-PCR 观察 IL-6 和 TNF- α 在刺激的不同时间点 mRNA 丰度的变化。

2 结果

2.1 大鼠 C5a 基因 cDNA 全长的扩增

按照材料与方法中的 PCR 反应体系和反应条件进行 PCR,反应终止后,2% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见约 250 bp 的特异性片段(图 1A)。

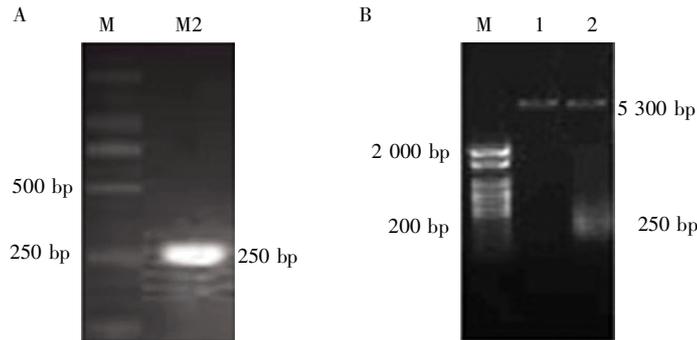
2.2 pIRES2-EGFP-C5a 真核表达质粒、pET-21a-C5a 原核表达质粒的构建和鉴定

重组质粒 pIRES2-EGFP-C5a 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后得到约 5.3 kb 和 250 bp 的 2 个条带(图 1B), 经过测序鉴定正确; 另 pET-21a-C5a 原核表达质粒测序正确, 外源序列在 NCBI-Blast 比对结果与 C5a 编码序列一致。

2.3 Western blot 检测 C5a 蛋白的表达

将构建的真核表达质粒 pIRES2-EGFP-C5a 转

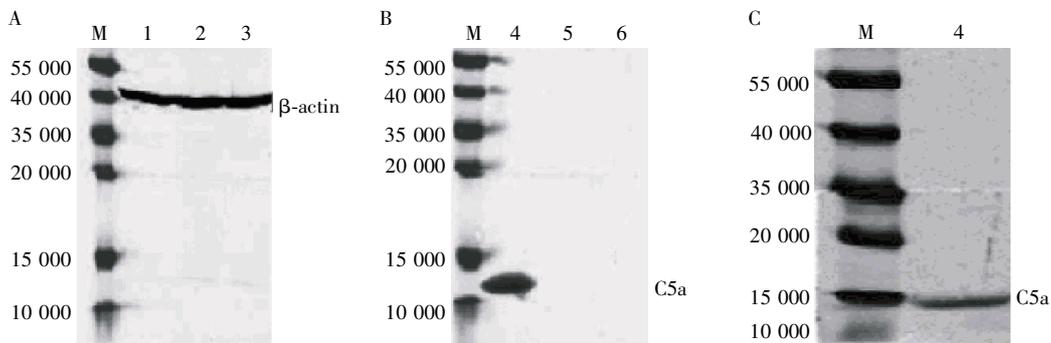
染到 HEK293 细胞中, 荧光显微镜下观察显示, 80% 以上细胞均有绿色荧光; 原核表达质粒 pET-21a-C5a 转化大肠杆菌 DH5 α , 收获蛋白用 Western blot 检测可见 C5a 蛋白表达(图 2A)。不过, 真核表达未发现 C5a 蛋白(图 2B)。收获蛋白进行亲和层析纯化后, Western blot 检测仍可见 C5a 蛋白(图 2C)。



A: C5a 基因 cDNA 全长的 PCR 产物, M 为 DL2000 marker, M2 为 C5a PCR 产物; B: 真核表达质粒 pIRES2-EGFP-C5a 酶切图, M 为 DL2000 marker, 1 为 *EcoR* I 单酶切产物, 2 为 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切产物。

图 1 真核、原核表达载体的构建

Figure 1 Construction of eukaryotic expression vector and prokaryotic expression vector



A: Western blot 检测 HEK293 细胞中 C5a 的表达, 1: 真核表达质粒 pIRES2-EGFP-C5a; 2: 空载质粒 pIRES2-EGFP; 3: HEK293 细胞; B: Western blot 检测原核表达蛋白, 4: 原核表达质粒 pET-21a-C5a; 5: 空载质粒 pET-21a; 6: DH-5 α 大肠杆菌提取蛋白; C: Western blot 检测 Ni²⁺柱纯化后的 C5a 蛋白。

图 2 Western blot 检测真核、原核表达的 C5a 蛋白

Figure 2 Identification of C5a by Western blot

2.4 C5a 刺激 PMN 诱导活性氧的产生

流式细胞仪分析 PMN 产生的活性氧, 结果显示, C5a 刺激组 PMN 活化率(39.6%)明显高于阴性对照组(10.4%)(图 3), 且 C5a 刺激组的平均荧光强度(MFI)较阴性对照组明显右移(图 4), 提示 C5a 刺激组的 PMN 产生活性氧量大于阴性对照组。

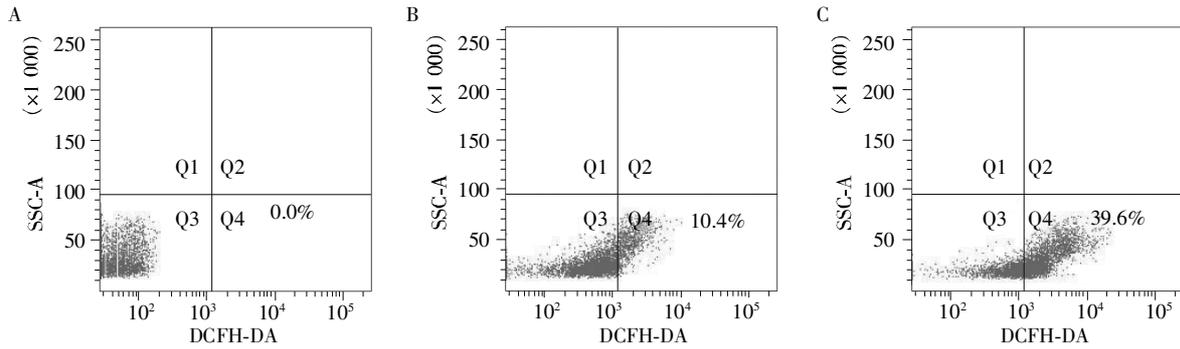
2.5 C5a 刺激大鼠 GMC 后诱导 IL-6 和 TNF- α 的表达

用 RT-PCR 检测 C5a 刺激 GMC 后不同时间段(0、30 min、1、2、4、8 h)IL-6 和 TNF- α mRNA 的丰

度。结果发现, 与对照组相比, C5a 刺激 GMC 后 4 h, IL-6 的丰度升高显著, 且处于高峰, 以后逐渐回落; C5a 刺激后 30 min TNF- α mRNA 的丰度开始上升, 在 4 h 到达高峰, 以后逐渐回落(图 5)。故本实验确定 C5a 刺激 GMC 后 4 h 为 IL-6 和 TNF- α 丰度的最佳检测时间点。

3 讨论

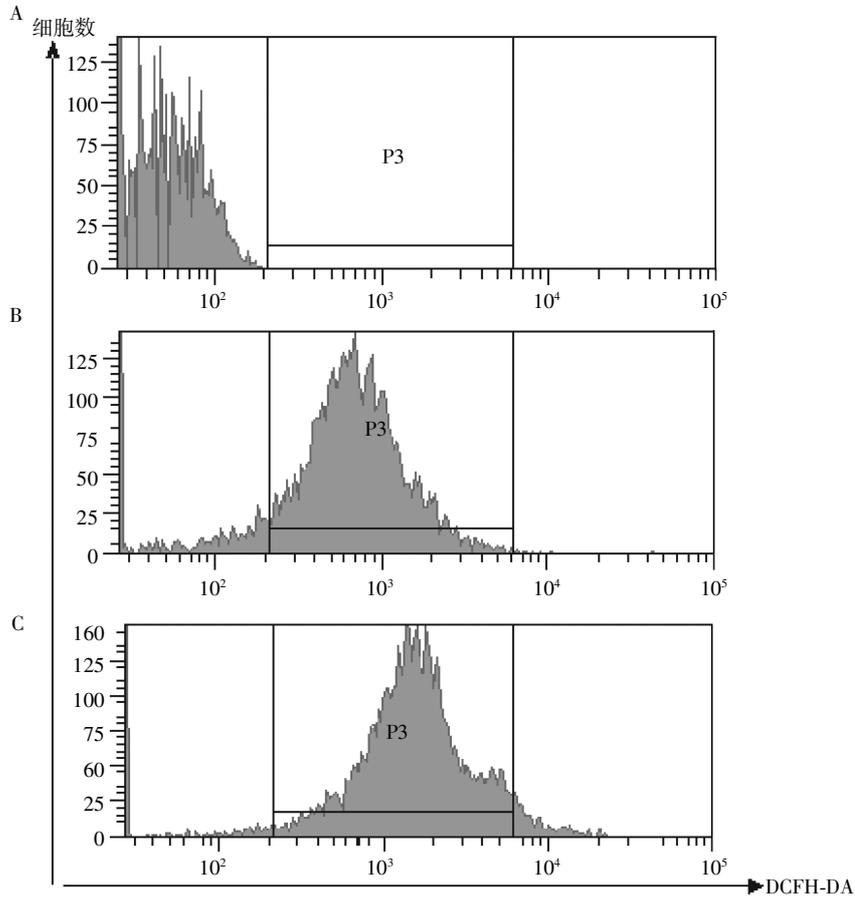
目前生命科学研究中, 研究的模式生物大多为真核生物。真核细胞本身的蛋白, 需尽量用真核表达



A:空白组;B:阴性对照组;C:C5a刺激组。

图3 C5a刺激中性粒细胞产生活性氧

Figure 3 Scatter plots of the reactive oxidative species generated from neutrophils by flow cytometry



A:空白组;B:阴性对照组;C:C5a刺激组。

图4 C5a刺激中性粒细胞产生活性氧的平均荧光强度

Figure 4 Mean fluorescence intensity plots of the reactive oxidative species generated from neutrophils by flow cytometry

系统,以便使表达的蛋白更有可能形成正确的结构、被糖基化修饰等,更具有天然功能。一般情况下,原核细胞表达重组蛋白,能以更低的成本获得更高的产量。当真核系统表达某种重组蛋白遇到困难时,恰当地使用原核细胞表达也能得到令人满意的产品^[12]。本文使用真核表达系统未检测到目的蛋

白,推测可能是与使用的工具细胞不适合表达C5a有关。已知有的蛋白较易在原核系统表达,而有的蛋白则易在真核系统中表达,表明这些基因的表达具有特异性,因此可根据特定的基因选用适当的表达系统。已知大肠杆菌用于表达重组蛋白有以下特点:易于生长和控制;用于细菌培养的材料不及哺乳动

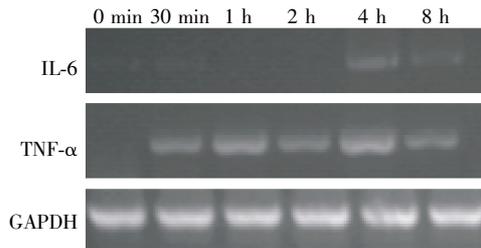


图 5 RT-PCR 检测 C5a 刺激 GMC 诱导 IL-6 和 TNF- α mRNA 丰度变化

Figure 5 The expression of IL-6 和 TNF- α mRNA in rat GMCs stimulated by C5a was detected by RT-PCR

物细胞系统的材料昂贵;有多种大肠杆菌菌株及与之匹配的具有各种特性的质粒可供选择。本实验选用了原核表达载体 pET-21a,结果发现,它能正确表达出大鼠 C5a 蛋白。

C5a 和 C5aR 之间相互作用有两个结合位点,第一个识别位点位于细胞外受体的 N 端,它与 C5a 的 N 端及硫化中心结合;第二个活化位点是由跨膜区域 G 蛋白偶联受体和 C5a 的 C 端结合后组成,可以介导一系列信号转导途径^[13]。因此,设计引物时将 6 个组氨酸标签设计在 N 端,防止 6 个组氨酸对小分子 C5a 蛋白活性产生干扰,而用亲和层析的方法可将 C5a 蛋白纯化出来。现阶段,人们多用免疫吸附技术,进行 SDS 凝胶电泳分离或利用层析柱凝胶过滤进行纯化^[14]。本实验采用 Ni²⁺亲和层析柱方法,结果成功纯化了 C5a 目的蛋白。

C5a 与中性粒细胞表面的 C5a 受体结合后,可活化中性粒细胞,增强其产生超氧化物的能力。荧光探针是一类无色、无荧光且稳定存在的染料分子,在与 ROS 发生反应后,探针的化学结构发生变化,生成具有强荧光的产物,因此通过检测反应产物的荧光强度可在一定程度上反映 ROS 水平^[15]。DCFH-DA 具有亲脂性,很容易通过细胞膜,在胞内被脂酶分解,去酰基形成有极性的 DCFH,虽本身不产生荧光,由于它的极性,可在胞浆中与 MPO 阳性颗粒接触,其中的 H₂O₂ 等活性氧能氧化 DCFH 为 DCF,可在流式细胞仪 525 nm 处检测到绿色荧光,其 DCF 形成量与细胞氧化产物水平呈正比例关系,其荧光强度能间接代表细胞内过氧化物的水平。DCFH 探针不仅仅针对 H₂O₂ 发生反应,还可被多种活性氧的成分如 O₂⁻、OH 等氧化形成 DCF,因此 DCF 的荧光强度应是细胞内活性氧产生的总体状况的反映。本实验用表达的大鼠 C5a 蛋白刺激大鼠外周血分离得到的中性粒细胞,中性粒细胞活化继而导致呼吸

氧爆发产生超氧化物,用流式细胞仪检测荧光强度的变化,计算中性粒细胞的活化率,发现在重组的 C5a 刺激下,中性粒细胞的活化率大大升高,提示纯化的 C5a 蛋白具有生物学活性。C5a 除能导致中性粒细胞发生呼吸氧爆发外,还能使中性粒细胞趋化,在后续的实验中将进一步探讨其对中性粒细胞的趋化能力。

[参考文献]

- [1] Wetsel RA, Lemons RS, Le Beau MM. Molecular analysis of human complement component C5: localization of the structure gene to chromosome 9 [J]. *Biochemistry*, 1988, 27(5):1474-1482
- [2] Monk PN, Scola AM, Madala P. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(4):429-448
- [3] Kohl J. Self, non-self, and danger: a complementary view [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 586(1):71-94
- [4] Boshra H, Peters R, Li J. Production of recombinant C5a from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): role in leucocyte chemotaxis and respiratory burst [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17(3):293-303
- [5] Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23:821-852
- [6] Flierl MA, Perl M, Rittirsch D. The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma [J]. *Shock*, 2008, 29(1):25-31
- [7] Gressner OA, Koch A, Sanson E. High C5a levels are associated with increased mortality in sepsis patients-no enhancing effect by actin-free Gc-globulin [J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(12):974-980
- [8] Pan H, Shen Z, Mukhopadhyay P. Anaphylatoxin C5a contributes to the pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(3):F496-f504
- [9] Szeplaki G, Varga L, Fust G. Role of complement in the pathomechanism of atherosclerotic vascular diseases [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(14):2784-2793
- [10] Marigo I, Dolcetti L, Serafini P. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells [J]. *Immunol Rev*, 2008, 222:162-179
- [11] Belladonna ML, Renauld JC, Bianchi R. IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2002, 168(11):5448-5464
- [12] 崔严方, 孙佩龙, 刘新奇. EIAV gp45 和 HIV gp120 基因在不同表达系统中表达效果比较 [J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(4):72-78
- [13] Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, et al. Complement

- component 5a (C5a) [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009,41(11):2114-2117
- [14] Refer L, Frank MM, Hanner CH. A simple method for purification of C5a from citrated plasma [J]. J Immunol Methods, 1982, 27, 53(1):41-50
- [15] Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues; Progress, pitfalls, and prospects [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(7):995-1022

[收稿日期] 2013-06-06

《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获首届 江苏省新闻出版政府奖

由中共江苏省委宣传部、江苏省新闻出版(版权)局、江苏省财政厅、江苏省人力资源和社会保障厅共同主办的首届江苏省新闻出版政府奖评选表彰结果公布,经评审委员会评审和评选工作领导小组审定,并经过严格的指标评定,《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获江苏省新闻出版政府奖报刊提名奖。该奖项中报刊奖期刊类20种,报刊提名奖期刊类14种。江苏省共有441种期刊出版,此次仅有34种期刊获此殊荣。