

鸡卵清提取液中小于3 kDa的成分有促细胞增殖的作用

阮光萍 王金祥 刘菊芬 舒帆 杨建勇 庞荣清 潘兴华*

(解放军昆明总医院干细胞工程实验室, 昆明 650032)

摘要 在前期研究中发现, 鸡卵清提取液有促细胞存活与增殖的作用。在该研究中, 作者进一步分离鸡卵清提取液各成分, 找到促细胞增殖的主要成分。用超滤管将鸡卵清提取液分为大于3 kDa和小于3 kDa的成分, 用于细胞增殖活性测定, 发现鸡卵清提取液中小于3 kDa的成分有促293T细胞增殖的作用。可将鸡卵清提取液分离小于3 kDa的成分作为促293T细胞增殖的有效成分。

关键词 鸡卵清提取液; 细胞增殖; 小分子物质

Components of Chicken Ovalbumin Extract Less Than 3 kDa in Size Promote Cell Proliferation

Ruan Guangping, Wang Jinxiang, Liu Jufen, Shu Fan, Yang Jianyong, Pang Rongqing, Pan Xinghua*

(Stem Cell Engineering Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming 650032, China)

Abstract We found that chicken egg extract could promote cell survival and proliferation. In this study, we further separated the components of chicken egg extract to find the main ingredient promoting cell proliferation. The chicken ovalbumin extract was separated into more than 3 kDa and less than 3 kDa components by ultrafiltration, and then their effect on cell proliferation activity were determined. Less than 3 kDa ingredients in chicken ovalbumin extract can promote 293T cell proliferation. We can separate less than 3 kDa fraction in the chicken ovalbumin as an active ingredient to promote 293T cell proliferation.

Key words chicken ovalbumin extract; cell proliferation; small molecules substance

前言

到目前为止, 很多文献报道鸡卵清提取液的成分及作用^[1-7], 但还没有文献报道鸡卵清提取液有促细胞增殖的作用^[8-12], 我们前期的研究证实, 鸡卵清提取液有促细胞增殖的作用^[13]。进一步分离鸡卵清提取液中大于3 kDa的蛋白成分和小于3 kDa的小分子物质, 用于细胞共培养, 我们的研究可以为细胞培养基提供一种方便获取的添加剂, 促进细胞的生长与增殖。

在前期研究中, 我们提取了鸡卵清、卵黄和全卵提取液, 发现卵清和全卵提取液有促细胞增殖的作用。继续研究发现, 主要是鸡卵清提取液的作用, 而且鸡卵清提取液获取方便, 提取过程只要注意无菌操作, 提取后无需过滤除菌即可用于细胞共培养。但具体是鸡卵清提取液中的什么成分促细胞增殖目前还不知道。对此, 我们进行了深入研究, 用超滤管将鸡卵清提取液分为>3 kDa的蛋白成分和<3 kDa的

收稿日期: 2014-05-22 接受日期: 2014-07-02

国家自然科学基金(批准号: 31172170)、国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2012CB518106)、国家支撑计划项目(批准号: 2014BAI01B01)和云南省高新技术产业发展专项(批准号: 201204)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-64774773, E-mail: ynkmy@163.com

Received: May 22, 2014 Accepted: July 2, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31172170), the National Key Basic Research and Development Program (973 Program) (Grant No.2012CB518106), the National Support Program (Grant No.2014BAI01B01) and the Special Project of High-new Technology Industrial Development in Yunnan Province (Grant No.201204)

*Corresponding author. Tel: +86-871-64774773, E-mail: ynkmy@163.com

网络出版时间: 2014-09-23 14:18 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0180.html>

小分子物质,用于293T细胞增殖活性检测。

1 材料与方法

1.1 材料

超滤管(截留量为3 kDa)购自Millipore公司;检测细胞增殖活性的试剂盒(CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)购自Promega公司;Bradford蛋白浓度测定试剂盒、2×上样缓冲液、染色液、脱色液均购自碧云天公司;电泳仪购自Bio-Rad公司;离心机由上海安亭科学仪器厂生产。

1.2 鸡卵清提取液制备

取一个鸡蛋,无菌分离卵清和卵黄。卵清按1:1加裂解液,充分搅匀,存放于4 °C。冻融3次后离心,取上清,4 °C保存。裂解液配方:50 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂、100 mmol/L HEPES(pH8.2)、1 mmol/L二硫苏糖醇(DTT, dithiothreitol)、0.1 mmol/L苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和2 μg/mL抑肽酶(aprotinin)。由此得到的提取液为卵清提取液。提取液留取50 μL,用Bradford方法测蛋白浓度。标记蛋白浓度和制备时间,分装保存于-20 °C。

1.3 鸡卵清提取液各成分分离

鸡卵清提取液用超滤管(截留量为3 kDa)分离不同组分,处理量为15 mL,用超滤管装15 mL鸡卵清提取液,离心4 000 r/min、30 min,离心后,滤膜下面滤过的是小于3 kDa的组分,滤膜上面获得大于3 kDa的组分。

1.4 细胞增殖活性检测

每块板分6组,每组分别加10孔,每孔各加50 μL培养基、PBS、HBSS、鸡卵清提取液、大于3 kDa和小于3 kDa的成分。将293T细胞浓度调为1×10⁵/mL,96孔板四周加100 μL PBS防蒸发,中间每孔50 μL细胞,每孔5×10³细胞,加入提取液50 μL,则提取液的终浓度为50%、40%、30%、25%、20%、10%、5%,每种提取液做10个复孔,在37 °C培养箱中培养3 d后,用Promega检测细胞增殖活性的试剂盒(CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)每孔加20 μL,37 °C放置3 h,在490 nm波长处比色。

1.5 统计方法

数据以均值±标准差表示,用SPSS 17.0软件分析,不同处理组间对比用One-way ANOVA, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鸡卵清提取液各成分SDS-PAGE结果

用Bradford法测蛋白浓度,结果如下:

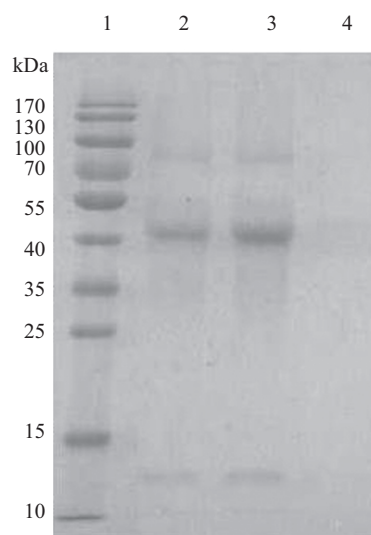
鸡卵清: 24 mg/mL;

大于3 kDa: 31 mg/mL;

小于3 kDa: 0.14 mg/mL。

鸡卵清和大于3 kDa的成分预先稀释100倍,然后3种成分各取样50 μL加50 μL 2×上样缓冲液,上样10 μL,电泳到胶的底部后染色3 h,脱色过夜,拍照观察结果。

鸡卵清提取液用超滤管分离>3 kDa和<3 kDa的成分后,电泳结果表明,鸡卵清主要有3个条带,80 kDa、45 kDa和12 kDa(图1)。



1: 蛋白分子量标准; 2: 鸡卵清提取液; 3: 鸡卵清中大于3 kDa的成分; 4: 鸡卵清中小于3 kDa的成分。

1: marker; 2: chicken ovalbumin extract; 3: more than 3 kDa component in chicken ovalbumin extract; 4: less than 3 kDa component in chicken ovalbumin extract.

图1 鸡卵清提取液各成分的电泳图

Fig.1 SDS-PAGE results of different components in chicken ovalbumin extract

SDS-PAGE电泳结果表明,小于3 kDa的成分,蛋白含量很低;大于3 kDa的成分,蛋白浓度大于鸡卵清。

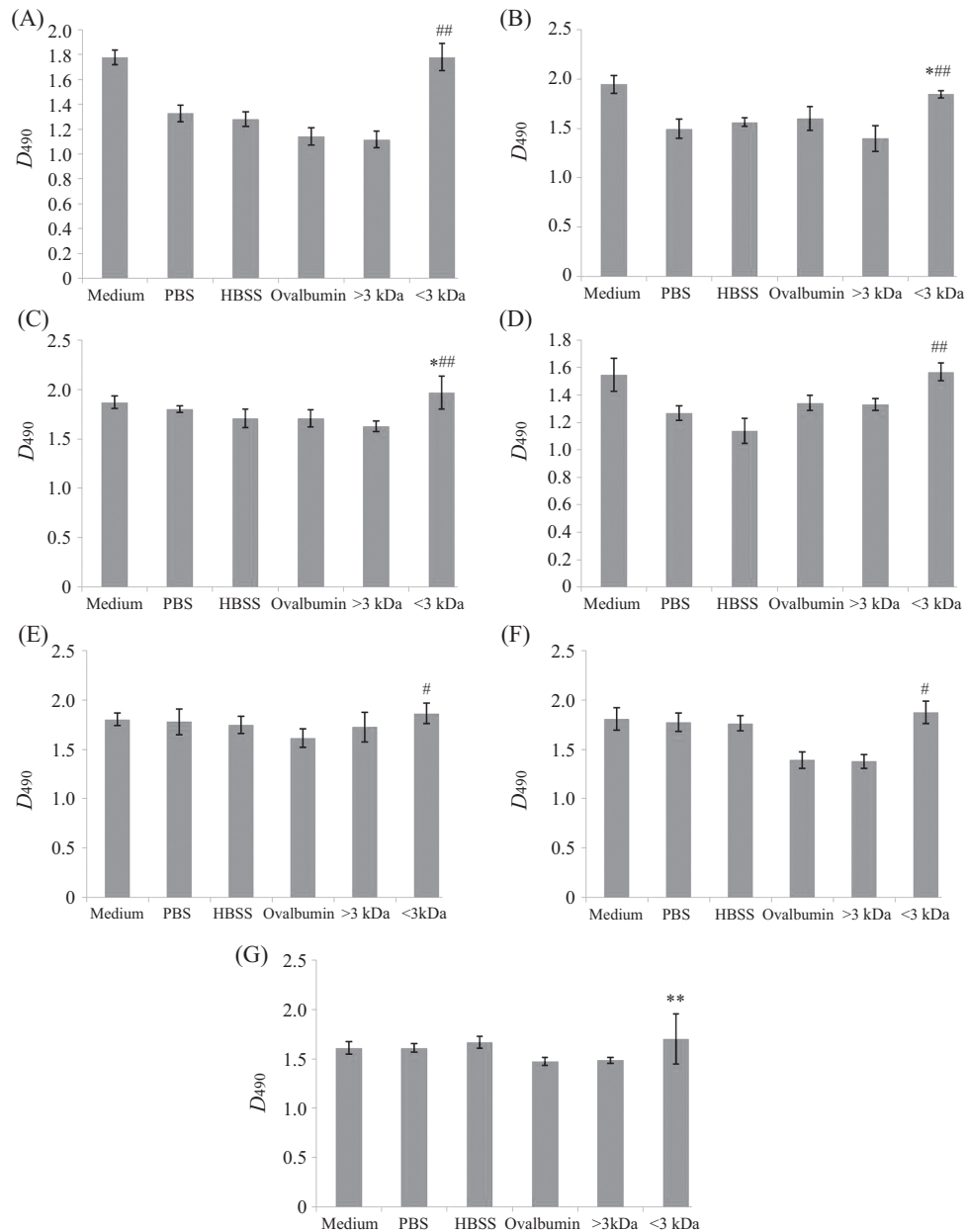
2.2 不同终浓度的鸡卵清提取液各成分促增殖作用不同

从图2A中可看出,50%终浓度的鸡卵清提取液中,<3 kDa的成分促细胞增殖的作用与培养基相当($P=0.973$),比PBS、HBSS、鸡卵清和>3 kDa的成分的作用都强($P < 0.01$)。

从图2B中可看出, 40%终浓度的鸡卵清提取液中, <3 kDa的成分促细胞增殖的作用仅次于培养基 ($P=0.019$), 比PBS、HBSS、鸡卵清和>3 kDa的成分

的作用都强($P<0.01$)。

从图2C中可看出, 30%终浓度的鸡卵清提取液中, <3 kDa的成分促细胞增殖的作用强于培养基



不同终浓度鸡卵清提取液各成分与293T细胞共培养3天的结果($n=10$)如下: A: 50%终浓度($P>0.05$, 与培养基比较, ### $P<0.01$, 与其他各组比较); B: 40%终浓度(* $P<0.05$, 与培养基比较, ### $P<0.01$, 与其他各组比较); C: 30%终浓度(* $P<0.05$, 与培养基比较, ### $P<0.01$, 与其他各组比较); D: 25%终浓度($P>0.05$, 与培养基比较, ### $P<0.01$, 与其他各组比较); E: 20%终浓度($P>0.05$, 与培养基和PBS比较, # $P<0.05$, 与其他各组比较); F: 10%终浓度($P>0.05$, 与培养基组比较, # $P<0.05$, 与其他组比较); G: 5%终浓度(** $P<0.01$, 与>3 kDa和鸡卵清相比, $P>0.05$, 与其他各组比较)。

Different component in chicken ovalbumin extract co-cultured with 293T cells for 3 days with different final concentration ($n=10$): A: 50% final concentration ($P>0.05$ compared with medium, ### $P<0.01$ compared with other groups); B: 40% final concentration (* $P<0.05$ compared with medium, ### $P<0.01$ compared with other groups); C: 30% final concentration (* $P<0.05$ compared with medium, ### $P<0.01$ compared with other groups); D: 25% final concentration ($P>0.05$ compared with medium, ### $P<0.01$ compared with other groups); E: 20% final concentration ($P>0.05$ compared with medium and PBS, # $P<0.05$ compared with other groups); F: 10% final concentration ($P>0.05$ compared with medium, # $P<0.05$ compared with other groups); G: 5% final concentration (** $P<0.01$ compared with >3 kDa and chicken ovalbumin extract, $P>0.05$ compared with other groups).

图2 不同终浓度的鸡卵清提取液各成分促293T细胞增殖作用不同

Fig.2 Different component in chicken ovalbumin extract at different final concentration have different promote 293T cell proliferation roles

($P < 0.05$), 比PBS、HBSS、鸡卵清和 >3 kDa的成分的作用都强($P < 0.01$)。这个结果使我们考虑可将鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分做为细胞培养基的添加剂, 终浓度为30%时可以更好地促细胞增殖。

从图2D中可看出, 用终浓度25%的鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分, 有促细胞增殖的作用, 作用与通常用的培养基相当($P = 0.597$)。比PBS、HBSS、鸡卵清和 >3 kDa的成分的作用都强($P < 0.01$)。

从图中2E可看出, 用终浓度20%的鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分, 有促细胞增殖的作用, 作用与通常用的培养基相当($P > 0.05$)。比HBSS、鸡卵清和 >3 kDa的成分的作用都强($P < 0.05$)。

从图2F中可看出, 用终浓度10%的鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分, 有促细胞增殖的作用, 作用与通常用的培养基相当($P = 0.11$)。比PBS、HBSS、鸡卵清和 >3 kDa的成分的作用都强($P < 0.05$)。

从图2G中可以看出, 鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分, 在5%终浓度时与培养基、PBS和HBSS作用相当($P > 0.05$), 但比鸡卵清和 >3 kDa的成分的作用强($P < 0.01$)。

3 讨论

一个鸡蛋中的卵黄就是一个卵细胞, 其中卵黄物质就是细胞质的主要成分, 它是胚胎发育时的营养物质。卵黄膜是细胞膜, 卵清、卵带和蛋壳是由输卵管分泌物形成的, 具有营养和保护的作用。因此, 我们制备鸡卵清、卵黄、全卵提取液来渗透293T细胞^[14-15], 观察对细胞存活和分化的作用。我们的研究发现, 鸡卵清提取物含有促进293T细胞存活和增殖的物质, 与对照相比有明显的差异。我们假设这些物质是鸡卵中的蛋白或小分子物质。因此, 我们用截留量为3 kDa的超滤管分离了鸡卵清中大于3 kDa的蛋白成分和小于3 kDa的小分子物质, 用于细胞增殖测定。

我们的结果表明, <3 kDa的成分有促细胞增殖的作用, 而当 <3 kDa的成分终浓度为30%时, 对细胞的促增殖作用比培养基还强, 这个结果使我们考虑可将鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分做为细胞培养基的添加剂, 在终浓度30%时可以更好地促细胞增殖。我们选择了平衡盐PBS和HBSS, 与鸡卵清全液、大于3 kDa和小于3 kDa的不同成分及培养基的促增殖作用进行对比, 在提取液和平衡盐溶液终浓度为

50%、40%、30%、25%、20%、10%、5%时分别进行对比, 结果始终稳定, 小于3 kDa的成分在各种终浓度时都表现出了较好的促细胞增殖活性。当终浓度降到5%时, 小于3 kDa的成分与培养基、PBS和HBSS作用相当($P > 0.05$), 但比鸡卵清和 >3 kDa的成分的作用强($P < 0.01$)。进一步说明了小于3 kDa的成分在终浓度为30%时, 可作为促细胞增殖的添加剂, 比通常用的培养基促增殖效果更好。

传统的MTT由于步骤繁琐、影响因素较多而使检测结果不稳定, 因此我们采用了进口的Promega公司的检测细胞活力的试剂盒(CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)检测细胞增殖活性, 每孔加20 μ L, 37 $^{\circ}$ C放置3 h, 490 nm比色。这个试剂盒简化了操作步骤, 不需要吸掉上清, 溶解沉淀, 而是共培养后直接比色, 使结果更准确, 更有重复性。由于96孔板存在边缘效应, 为防止边上的孔因为蒸发而使结果不准确, 我们排除了边上的孔, 并加入100 μ L PBS防止边缘效应, 为保证结果准确, 每种提取液每个浓度我们设了10个复孔, 取均值 \pm 标准差, 使结果更具有可比性。

我们的结果表明, 鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分其终浓度为30%时, 有强于培养基的促细胞生长作用, 因此我们可以考虑分离鸡卵清提取液中 <3 kDa的成分做为细胞培养基的添加剂, 有促细胞增殖生长的作用。

参考文献 (References)

- 1 Abeyrathne ED, Lee HY, Ahn DU. Separation of ovotransferrin and ovomucoid from chicken egg white. *Poult Sci* 2014; 93(4): 1010-7.
- 2 Fang J, Ma MH, Qiu N, Wu X, Jin YG. Analysis of the low-molecular weight protein profile of egg-white and its changes during early chicken embryological development. *Z Naturforsch C* 2012; 67(3/4): 208-14.
- 3 Kodama D, Nishimiya D, Nishijima K, Okino Y, Inayoshi Y, Kojima Y, *et al.* Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *J Biosci Bioeng* 2012; 113(2): 146-53.
- 4 Li L, He L, Tan S, Guo X, Lu H, Qi Z, *et al.* 3-hydroxyphthalic anhydride-modified chicken ovalbumin exhibits potent and broad anti-HIV-1 activity: A potential microbicide for preventing sexual transmission of HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(5): 1700-11.
- 5 Lingappa VR, Lingappa JR, Blobel G. Chicken ovalbumin contains an internal signal sequence. *Nature* 1979; 281(5727): 117-21.
- 6 Mayer S, Roeser M, Lachmann P, Ishii S, Suh JM, Harlander S, *et al.* Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor

- II regulates renin gene expression. *J Biol Chem* 2012; 287(29): 24483-91.
- 7 McReynolds L, O'Malley BW, Nisbet AD, Fothergill JE, Givol D, Fields S, *et al.* Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature* 1978; 273(5665): 723-8.
- 8 Mizutani A, Tsunashima H, Nishijima K, Sasamoto T, Yamada Y, Kojima Y, *et al.* Genetic modification of a chicken expression system for the galactosylation of therapeutic proteins produced in egg white. *Transgenic Res* 2012; 21(1): 63-75.
- 9 Qiu N, Liu W, Ma M, Zhao L, Li Y. Differences between fertilized and unfertilized chicken egg white proteins revealed by 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis. *Poult Sci* 2013; 92(3): 782-6.
- 10 Shin SW, Kwon HC, Rho MS, Choi HJ, Kwak JY, Park JI. Clinical significance of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II expression in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 2009; 21(1): 101-6.
- 11 Yang Y, Barendregt A, Kamerling JP, Heck AJ. Analyzing protein micro-heterogeneity in chicken ovalbumin by high-resolution native mass spectrometry exposes qualitatively and semi-quantitatively 59 proteoforms. *Anal Chem* 2013; 85(24): 12037-45.
- 12 Yoo W, Nakamura T, Asanuma H, Matsushita M. Molecular cloning, genomic structure, and tissue distribution of EW135, a novel chicken egg white protein with group B scavenger receptor cysteine-rich domains. *Immunogenetics* 2013; 65(11): 785-93.
- 13 Ruan GP, Wang JX, Pang RQ, Yao X, Cai XM, Wang Q, *et al.* Treatment with chicken-egg-white or whole-egg extracts maintains and enhances the survival and differentiation of spleen cells. *Cytotechnology* 2012; 64(5): 541-51.
- 14 Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell* 2007; 18(5): 1543-53.
- 15 Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16(12): 5719-35.