

Fas 胞外区基因的构建、表达、纯化及多克隆抗体的制备

张佳锴^{1,2}, 孟庆宇¹, 程小峰¹, 刘瑞振¹, 庄国洪¹

(厦门大学 1. 医学院 抗癌研究中心, 2. 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 构建 Fas 胞外区 (eFas) 基因的表达载体, 表达纯化重组蛋白, 进行多克隆抗体的制备, 为进一步功能研究奠定基础。方法 通过重叠 PCR 获得 eFas 基因的编码序列, 构建 pET22b(+)/eFas 表达载体, 转化大肠杆菌 Rosetta-gami, IPTG 诱导表达, Ni-NTA 柱亲和纯化, SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的纯度。将纯化的 eFas 融合蛋白免疫新西兰白兔制备多克隆抗体, 通过 ELISA 方法检测多克隆抗体的效价。结果 获得了 eFas 的编码序列与表达载体, 目的蛋白主要在包涵体中表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上, 纯化的重组蛋白纯度达 95% 以上。结论 eFas 融合蛋白基因的构建、表达、纯化以及多克隆抗体的制备, 为进一步研究 Fas 提供了材料。

关键词: Fas; 细胞凋亡; 多克隆抗体

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2010)01-0035-05

Construction, expression, purification and polyclonal antibody preparation of Fas extracellular region gene

ZHANG Jia-kai^{1,2}, MENG Qing-yu¹, CHENG Xiao-feng¹, LIU Rui-zhen¹, ZHUANG Guo-hong¹

(1. Anti-cancer Research Center of Medical School, 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: **Purpose** To construct expression vector of Fas extracellular region gene (eFas), to express and purify recombination protein and to prepare polyclonal antibody, which have laid a foundation of studying its function. **Methods** The eFas gene encoding sequence was acquired through overlapping PCR, and pET-22b(+)/eFas expression vector was constructed. Then this vector was transformed into *E. coli* Rosetta-gami. Recombinant protein was expression being induced by IPTG, and was purified using Ni-NTA matrix of affinity chromatograph. The purity of recombination protein was identified by SDS-PAGE. Hereafter, the purified eFas recombinant protein was immunized to New Zealand white rabbit in order to prepare polyclonal antibody. The titer of polyclonal antibody was determined by ELISA. **Results** The encoding sequence and expression vector of eFas was obtained while the interest protein was mainly expressed in the inclusion body. The eFas fusion protein's expression quantity accounts for more than 30% proportion of total *E. coli* protein. The eFas protein we obtained was provided with the purity of at least 95%. **Conclusion** The successful construction, expression and purification of FasL fusion protein and preparation of polyclonal antibody will provide some material for further studies of Fas.

Key words: Fas; apoptosis; polyclonal antibody

Fas/Apo-1/CD95 属于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受体超家族, 为 I 型跨膜蛋白。

人 Fas 基因定位于第 10 号染色体 (10q24) 上, 基因长度为 2 534 bp, 编码 319 个氨基酸^[1]。Fas 分子结构由膜外的 N 末端、跨膜区和膜内 C 末端三部分组成。其中跨膜区上有一段具有细胞凋亡信号传导作用的肽段, 称为“死亡域” (death domain, DD)。Fas 广泛分布于活化的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞, 也存在于粒细胞、巨噬细胞及 HIV、EBV 转化的淋巴细胞; 非淋巴细胞如上皮细胞、足突细胞、肿

收稿日期: 2009-06-29

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20083008)

作者简介: 张佳锴 (1984-), 男, 福建漳州人, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫、动物分子生物学研究, Tel: 0592-2180587; E-mail: baroce @163.com; 庄国洪, 通信作者, E-mail: zhuangguohong @yahoo.com.cn.

瘤细胞也有不同程度的表达^[1-2]。Fas 可通过与 FasL 或特异性抗体的相互作用而诱导细胞凋亡^[3-6]。Fas/FasL 系统的异常可导致各种疾病,如自身免疫病、变态反应性疾病、肿瘤、肝炎和器官移植排斥等^[7-10]。使用可溶性 FasL 或抗 Fas 抗体被认为是治疗这些疾病的突破点。

然而,重组人可溶性 FasL 在体外诱导表达 Fas 的 T 细胞凋亡时,表现出较低的凋亡诱导活性^[11],且重组可溶性 FasL 在血液中的半衰期比抗体短得多。另外,在小鼠身上使用 FasL 超过一定剂量时,易引起小鼠肝细胞凋亡甚至死亡^[12]。因此,构建 Fas 胞外区 (eFas) 基因,表达纯化获得 eFas 重组蛋白,并利用 eFas 为抗原,制备多克隆抗体,可以为功能研究及上述问题的解决提供良好条件。

1 材料

大肠杆菌 Rosetta-gami 菌株、质粒 pET-22b (+) 均购自 Novagen 公司;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,测序工作由上海英骏生物技术有限公司完成;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及

Pfu DNA 聚合酶均为 NEB (New England Biolabs) 公司产品;质粒提取、胶回收试剂盒与酶切产物回收试剂盒均购于 OMEGA 公司;Ni-NTA 带 His 标签蛋白纯化树脂为 Qiagen 公司产品;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体由厦门波生公司惠赠。雄性新西兰白兔 2 只购自上海陈行实验用兔有限公司。

2 方法

2.1 Fas 胞外区基因的构建

从 GenBank 上查得 Fas 胞外区 (eFas) 基因序列,将其分成 7 个长引物片段分别合成 (表 1),每对引物有 18 个碱基互补。第 1 步,将 7 段长引物片段混合于同一 PCR 体系中,通过重叠 PCR 拼接获得 Fas 胞外区基因序列,反应条件为:95 变性 5 min,65 退火 4 h,72 延伸 10 min。第 2 步,以第 1 步重叠 PCR 的产物为模板,以 eFas F/eFas R 为上下游引物进行 PCR,并在这两条引物上分别引入 *Nco* 和 *Xho* 酶切位点,反应条件均为:95 预变性 4 min,95 变性 40 s,58 退火 45 s,72 延伸 1 min,循环数为 30。

表 1 构建 Fas 胞外区序列引物表

Tab. 1 Primers for construction of Fas extracellular region

引物名称	引物序列
eFas S1	5 ATGCTGGGCACTCTGGACCCCTCTACCTCTGGTCTTACGICTGTGCTAGATTATCGICCAAAA GIGTTAATGCCAAAGTGAC 3
eFas S2	5 CCAAGTCTCTGAGTCTCAACTGTAGTAAACAGTCTTCCTCAATTCCAATCCCTTGGAGTGTATGTCAGTCACTTGGGCAATTAACA 3
eFas S3	5 TTGAGACTCAGAACTTGGAAAGCCCTGCATCATGATGGCCAAATTCGCCATAAGCCCTGTCCTCCAGGTGAAA GAAA GCTAGG 3
eFas S4	5 TCTGTGTACTCCTTCCCTTCTTGGCAGGGCAGCGAGTCTGGTTCATCCCAATTGACTGTGCA GTCCTTACCTTTCCTTTCACC 3
eFas S5	5 AGGGAAAGAGTACACAGACAAA GCCCATTTTCTTCCAAATGCA GAA GATGTA G ATTGTGTGTGAA GGACATGGCTTA GAAG 3
eFas S6	5 GTTACAAAAAAAGTTGGTTTACATCTGCACCTTGGTATCTTGGGTCGGGGTGCAGTTTATTTCCACTTCTAA GCCATGTCCTT 3
eFas S7	5 CCAAACTTTTTTTGTAACCTACTGTATGTGAACACTGTGACCCTTGACCAAAATGTGAACATGGAATCATCAAGGAATGC 3
eFas F	5 TGTA <u>CCATGGCCTGGGCATCTGG</u> 3
eFas R	5 GCTACTC <u>GAGGCATTCCTTGATGAT</u> 3

本实验的 Fas 胞外段基因组成如图 1 所示。其中,下划线部分为酶切位点序列,斜体部分为融合的 6 × His 标签序列。

2.2 Fas 胞外区表达载体的构建

第 2 步 PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收后的基因序列与质粒 pET-22b (+) 分别经 *Nco* / *Xho* 限制性内切酶消化,进行双酶切。分别回收后,以 eFas pET-22b (+) 为 10:1 的比例混合,用 T4 DNA 连接酶进行连接,得到 eFas/pET-22b (+) 重组质粒。重组质粒转化 DH5 大肠杆菌,菌液涂于含 100 μg/mL Amp (氨苄青霉素) 的 LB 平板上,37 培养 14 h 后,挑取单菌落于装有 LB 液体培养基 (含 100 μg/mL Amp) 3 mL 的试管中,放于 37 摇床,250 r/min 培养过夜后,对重组子进行菌液

PCR 筛选、酶切鉴定,阳性克隆送英骏公司测序。

2.3 Fas 胞外区蛋白的表达和纯化

将测序正确的重组基因工程菌接于 LB 液体培养基 (含 100 μg/mL Amp) 3 mL 中,37 振荡培养过夜,次日按 1:100 的比例稀释到 LB 培养液 (含 100 μg/mL Amp) 200 mL 中,37 振荡培养至 A_{600} 值为 0.6~0.8 时加入 IPTG,终浓度为 0.5 mmol/L,诱导表达 12 h。用 Ni-NTA 树脂亲和色谱柱纯化带 6 个组氨酸标签的重组蛋白,操作步骤参照 Ni-NTA 色谱柱说明书“*The QIAexpressionist™ handbook*”: 加适量 Ni-NTA 树脂到 20 倍体积的变性缓冲液 (100 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris·HCl, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 溶解后的包涵体溶液中;以 200 r/min 的速度摇 60 min;将树脂与包涵体变性溶液的混合

	10	20	30	40	50	60
1	CCATGGCGTGGGCATCGGACCCCTCCTACCTCGTGGTCTTACGTCTGTGCTAGATTATCG					
1	MetAlaLeuGlyIleTrpThrLeuLeuProLeuValLeuThrSerValAlaArgLeuSer					
	70	80	90	100	110	120
61	TCCAAAAGTGTAAATGCCAAGTGACTGACATCACTCCAAGGGAATGGAATGAGGAAG					
21	SerLysSerValAsnAlaGlnValThrAspIleAsnSerLysGlyLeuGluLeuArgLys					
	130	140	150	160	170	180
121	ACTGTACTACAGTGTGAGACTCAGAAGCTTGAAGGCGTCATCATGATGCCAATCTTGC					
41	ThrValThrThrValGluThrGlnAsnLeuGluGlyLeuHisAspGlyGlnPheCys					
	190	200	210	220	230	240
181	CATAAGCCCTGTCTCCAGTGAAGGAAGCTAGGGACTGCACAGTCAATGGGATGAA					
61	HisLysProCysProProGlyGluArgLysAlaArgAspCysThrValAsnGlyAspGlu					
	250	260	270	280	290	300
241	CCAGACTGCCTGCCAAGAAGGAGTACACAGACAAAGCCCAATTTTCTTCC					
81	ProAspCysValProCysGlnGluGlyLysGluTyrThrAspLysAlaHisPheSerSer					
	310	320	330	340	350	360
301	AAATGCAGAAAGTGTAGATTGTGTGATGAAGACATGGCTTAGAAGTGAATAAAGTGC					
101	LysCysArgArgCysArgLeuCysAspGluGlyHisGlyLeuGluValGluIleAsnGly					
	370	380	390	400	410	420
361	ACCCGGACCCAGAATACCAAGTGCAGATGTAACCAAACTTTTTTGTAACTCTACTGTA					
121	ThrArgThrGlnAsnThrLysCysArgCysLysProAsnIlePheCysAsnSerThrVal					
	430	440	450	460	470	480
421	TGTGAACACTGTGACCCCTGCACCAATGTGAACATGGAATCATCAAGGAATGCTCGAG					
141	CysGluHisCysAspProCysThrLysCysGluHisGlyIleIleLysGluCysLeuGlu					
	490					
481	CACCACCACCCACCAC					
161	HisHisHisHisHisHisHis					

图 1 Fas 胞外区基因序列及氨基酸序列

Fig. 1 Fas extracellular region gene sequence and amino acid sequence

液倒入底部装有网筛的玻璃柱中,打开下端的排液阀,收集流出液体,重复过柱 3 次;用 4 倍体积的洗涤缓冲液(100 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris·HCl, 8 mol/L 尿素, pH 6.3)冲洗镍柱,洗掉杂蛋白;

以 4 倍体积的洗脱缓冲液(100 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris·HCl, 8 mol/L 尿素, pH 4.5)洗脱带 6 个组氨酸标签的目的蛋白;纯化后的蛋白采用尿素梯度透析法复性,并用聚乙二醇 20000 进行吸水浓缩。以 12% 的 SDS-PAGE 分析蛋白表达量与纯度。以 Lowry 法绘制牛血清白蛋白标准浓度曲线,经拟合获得蛋白浓度与 A_{640} 的直线方程,按常规方法计算待测蛋白质的浓度^[13]。

2.4 多克隆抗体的制备

取纯化的融合蛋白和等体积弗氏完全佐剂充分乳化,皮下多点注射新西兰白兔,每只兔的用量为 350 μg ;每间隔 2 周用弗氏不完全佐剂加强免疫 1 次,共加强免疫 4 次,每次免疫的剂量相同,从第 3 次免疫后 1 周开始测定血清抗体效价(ELISA 法,参照试剂盒说明),末次免疫两周后心脏采血、分离血清、分装, - 20 保存。

2.5 多克隆抗体的效价测定

用纯化的 eFas 重组蛋白(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被 96 孔酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 过夜,以等浓度的 BSA 作为阴性对照,各 3 个复孔。37 封闭 1 h。将含多克隆抗体的白兔血清在另一块板上用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 连续稀释(按照 1:10 倍比稀释),100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加到已包被的板上,每个样品平行做两份,以 PBS 作为阴性对照,37 温育 1 h。加辣根过氧化氢酶(HRP) 标记的羊抗兔抗体 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 温育 30 min。加入过氧化氢和 TMB 显色液 A 液和 B 液各 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,避光显色 15 min。以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,每个步骤间都用 PBST(0.01 mol/L PBS 加 0.5% Tween-20) 洗涤 5 次,甩干。在酶标仪上在 450 nm 波长处测定 A 值。 P/N 值 = (A 样品 - A 空白对照) / (A 阴性样品 - A 空白对照), P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性,反之则为阴性。阳性反应的最大稀释度即为待测样品的效价^[14]。

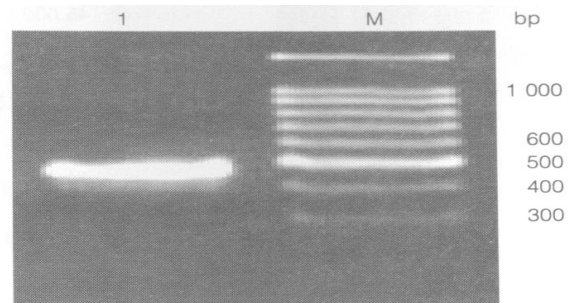
2.6 多克隆抗体与抗原的 Western blot 鉴定

以抗原(eFas, 1.2 mg/mL) 10, 20, 30 μL 进行 SDS-PAGE,将蛋白转印至 PVDF 膜上,多克隆抗体(兔血清,1:1000),HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5000) 先后孵育、漂洗、显影检测蛋白。

3 结果

3.1 eFas 基因编码序列的构建

经两步 PCR 将 7 个长引物片段拼接成完整的 eFas 基因序列,并引入 *Nco* / *Xho* 酶切位点。经琼脂糖凝胶电泳检测,条带位于 490 bp 附近,与理论值相符(图 2)。



1. eFas(490 bp); M. 100 bp DNA Ladder

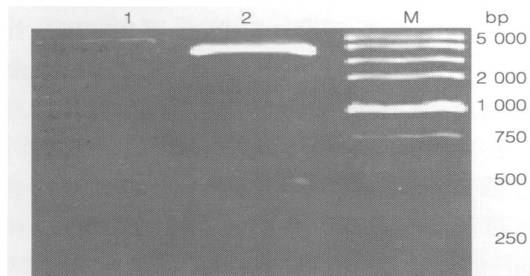
图 2 Fas 胞外段编码序列的 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product containing eFas gene

3.2 重组质粒的鉴定

重组子利用 T7 通用引物和 eFas 基因的特异性引物进行 PCR 鉴定,阳性的克隆提取质粒经 *Nco* 及 *Xho* 酶切后,用琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到两条目的条带,分别为 eFas 条带、pET-22b(+) 条带(图

3)。阳性克隆送上海博亚公司测序,测序结果表明获得一正确序列的重组子。



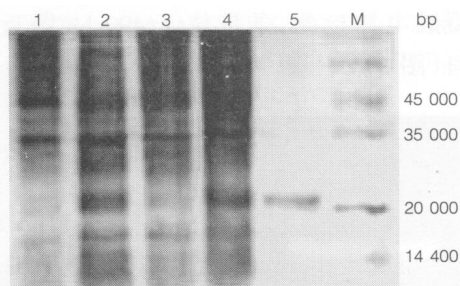
1. eFas/pET22b(+); 2. pET22b(+)/eFas(490 bp) (Double digestis with *Nco* *Xho*); M. DNA Ladders

图 3 重组 eFas/pET22b(+) 质粒的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of eFas/pET22b(+) recombinant plasmid using double digestis method

3.3 Fas 蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化

含重组质粒 pET-22b(+)/eFas 的大肠杆菌 Rosetta-gami 经 IPTG 诱导,收集菌体沉淀进行超声破菌,利用 12% SDS-PAGE 检测,发现目的蛋白主要在包涵体中表达,表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。包涵体经洗涤和溶解, Ni-NTA 亲和色谱柱纯化后复性。复性用透析法,采用逐步降低尿素浓度的方法除去蛋白质溶液中的尿素。Lowry 法绘制标准蛋白浓度曲线,测得蛋白质浓度为 1.2 mg/mL。SDS-PAGE 结果如图 4 所示,在相对分子质量(M_r) 20 000 与 35 000 之间有一特异条带(箭头所指),符合目的蛋白理论推算值(约 20 724)(图 4),扫描分析显示其纯度达 95% 以上。



1. 未用 IPTG 诱导; 2. 已用 IPTG 诱导; 3. 破菌上清; 4. 包涵体沉淀; 5. 纯化后的 eFas 蛋白; M. 蛋白分子量标准

1. IPTG(+) pET-22b(+)/eFas; 2/ IPTG(+) pET-22b(+)/eFas; 3. Lysate supernatant; 4. Inclusion bodies in the deposit; 5. Purified eFas protein; M. Protein marker

图 4 SDS-PAGE 分析 eFas 表达及纯化

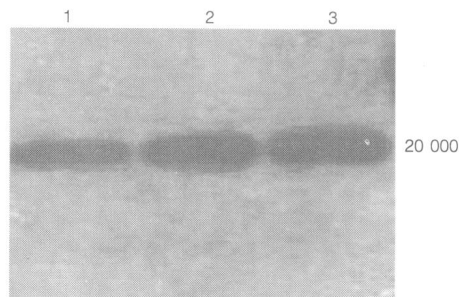
Fig. 4 SDS-PAGE analysis for the expression and purity of eFas protein

3.4 多克隆抗体效价测定

间接 ELISA 法测得两只白兔血清中多克隆抗体的效价分别为 1×10^6 和 1×10^8 。

3.5 多克隆抗体与抗原的 Western blot 鉴定结果

分别用依次递增量的抗原与含有多克隆抗体的兔血清进行 Western blot,在 M_r 20 000 附近出现单一特异性条带(图 5),与预期结果一致。



1~3. 重组 eFas 蛋白(1.2 mg/mL) 分别为 10, 20, 30 μ L

1-3. Recombinant eFas protein(1.2 mg/mL) were 10, 20, 30 μ L respectively

图 5 抗血清与重组 eFas 蛋白 Western blot

Fig. 5 Western blot of antiserum and recombinant eFas protein

4 讨论

本实验以 GenBank 公布的人 Fas cDNA 序列为基础,去除 N 端信号肽、跨膜及胞内区序列,仅保留胞外区序列。经过两轮 PCR,成功构建出 Fas 胞外区基因编码序列(490 bp,包括酶切位点和保护碱基),在引入了 *Nco* 和 *Xho* 两个酶切位点后,可将 eFas 基因克隆进高效表达质粒 pET-22b(+),成功地构建出 pET-22b(+)/eFas 表达载体。经测序发现 eFas 基因成功克隆进表达载体,且开放阅读框与 GenBank 提供的序列比较后准确无误。表达载体转化入大肠杆菌 Rosetta-gami 后,检测到目的蛋白主要以包涵体形式存在。这既有效防止了大肠杆菌胞内蛋白酶对目的蛋白的降解,又便于分离纯化。因带 6 个组氨酸标签的融合蛋白表达量占菌体总蛋白的 30% 以上,即使复性效率不高,仍能获得大量正确折叠的目的蛋白,且纯化后的 eFas 蛋白的纯度达到 96%。电泳结果显示,我们获得的 eFas 蛋白 M_r 与理论值相符,可作为抗原免疫新西兰白兔以制备多克隆抗体。

我们制备的多克隆抗体经 ELISA 实验测得效价较高,达到 1×10^8 和 1×10^6 ,且 Western blot 结果显示多克隆抗体是重组 eFas 蛋白的特异性抗体,故该多克隆抗体可以与 eFas 一同为进一步分析 Fas 功能、研究 Fas/FasL 相互作用、探讨抗体与 Fas 结合及发挥功能的机制等提供条件。

参考文献:

- [1] Wesche-Soldato D E, Chung C S, Gregory S H, et al. CD8⁺ T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis: role of Fas-FasL[J]. Am J Pathol, 2007, 171(1): 87-96.
- [2] Zhang B, Sun T, Xue L, et al. Functional polymorphisms in Fas and FasL contribute to increased apoptosis of tumor infiltration lymphocytes

- and risk of breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(5):1067-1073.
- [3] Trauth B C, Klas C, Peters A M, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis[J]. *Science*, 1989, 245:301-305.
- [4] Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The p190 protein encoded by the cDNAs for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis[J]. *Cell*, 1991, 66:233-243.
- [5] Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family[J]. *Cell*, 1993, 75:1169-1178.
- [6] Watanabe-Fukunaga R, Brannan C I, Itoh N, et al. The structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen[J]. *J Immunol*, 1992, 148:1274-1279.
- [7] Hwa T T, Hasunuma T, Aono H, et al. Novel mechanisms of selective apoptosis in synovial T cells of patients with rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 1996, 23:1332-1337.
- [8] Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice[J]. *Nature*, 1993, 364:806-809.
- [9] Dhein J, Walczak H, Westendorp M O, et al. Molecular mechanisms of APO-1/Fas (CD95)-mediated apoptosis in tolerance and AIDS[J]. *Behring Inst Mitt*, 1995, 96:13-20.
- [10] Chu J L, Ramos P, Rosendorff A, et al. Massive upregulation of the Fas ligand in lpr and gld mice: implications for Fas regulation and the graft-versus-host disease-like wasting syndrome[J]. *J Exp Med*, 1995, 181:393-398.
- [11] Tanaka M, Itai T, Adachi M, et al. Downregulation of Fas Ligand by shedding[J]. *Nature Med*, 1998, 4:31-36.
- [12] Tanaka M, Suda T, Yatomi T, et al. Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium* [J]. *J Immunol*, 1997, 158:2303-2309.
- [13] 金慧英, 唐治华. 葡萄球菌蛋白 A 抗体结合区基因的克隆、表达和纯化[J]. *中国生化药物杂志*, 2009, 30(1):38-40.
- [14] 刘瑞振, 张长弓, 庄国洪, 等. 抗人 DcR3 单克隆抗体的制备、鉴定及应用[J]. *免疫学杂志*, 2009, 25(1):34-38.

氨基葡萄糖与硫酸软骨素复方片的抗炎、镇痛作用

韩 刚, 原海忠, 董 月, 翟冠钰, 范 颖

(华北煤炭医学院 药学系, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 将氨基葡萄糖与硫酸软骨素制成复方片剂, 考察其抗炎与镇痛作用。方法 氨基葡萄糖与硫酸软骨素按 5:4 的比例压片制成复方片剂。以 SD 大鼠为实验动物, 建立足趾肿胀模型进行抗急性炎症实验; 采用棉球植入法进行抗慢性炎症实验; 以 ICR 小鼠为实验动物, 建立小鼠疼痛模型进行镇痛实验。结果 给药 28 d, 足趾肿胀 1 h, 低、中、高剂量组足趾肿胀度明显小于正常对照组 ($P < 0.05$)。大鼠肉芽肿实验结果显示各给药组与正常组相比能明显抑制大鼠肉芽肿 ($P < 0.05$)。醋酸致小鼠扭体实验显示各给药组与对照组比较, 对醋酸致小鼠扭体次数有明显的抑制 ($P < 0.05$)。结论 氨基葡萄糖与硫酸软骨素复方片具有抗炎作用; 对醋酸致小鼠疼痛模型具有镇痛作用。

关键词: 氨基葡萄糖; 硫酸软骨素; 抗炎; 镇痛; 复方片剂

中图分类号: R961 文献标识码: A 文章编号: 1005-1678(2010)01-0039-03

The effects of glucosamine and chondroitin sulfate compound tablet on anti-inflammatory and analgesic

HAN Gang, YUAN Hai-zhong, DONG Yue, ZHAI Guan-yu, FAN Ying

(School of Pharmaceutical Science, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Purpose** The glucosamine and chondroitin compound tablets were prepared. The anti-inflammatory and analgesic effects of glucosamine and chondroitin compound tablets were investigated. **Methods** The proportion of glucosamine and chondroitin was 5:4 to prepare compound tablets. The anti-inflammatory effect

收稿日期: 2009-06-05

作者简介: 韩刚(1957-), 男, 教授, 主要从事药物新剂型的研究,

Tel: 13730509861。

