

## 用 Streamline SP 从大肠杆菌中初步分离纯化 anti-HBsAg Fab 最适吸附条件的选择及验证

黄宇贤, 罗荣城, 丁雪梅, 郑大勇, 方永鑫(南方医科大学南方医院肿瘤中心, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 选择阳离子交换介质 Streamline SP 分离纯化 anti-HBsAg Fab 的最适吸附条件。方法 试管法分别测定平衡缓冲液在不同 pH 和不同离子强度下 阳离子交换介质 Streamline SP 对预分离纯化蛋白的吸附效果。用 1 ml SP 预装柱及自装 28 ml Streamline SP 柱进行离子交换层析以验证吸附效果。结果 NaAc-HAc 作为平衡缓冲液在 pH4.4、离子强度 100~600 mmol/L 可以使阳离子交换介质 Streamline SP 与蛋白吸附达到最佳效果。在该条件下用 1 ml SP 预装柱及自装 28 ml SP 柱进行离子交换层析, 均验证了这一吸附效果。结论 试管法选择的离子交换层析的最适吸附条件用于从大肠杆菌中初步分离纯化 anti-HBsAg Fab 切实可行。

**关键词:** 试管法; anti-HBsAg Fab; 离子交换层析; 纯化

中图分类号: R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)04-0409-05

### Adsorption condition optimization for anti-HBsAg Fab fragment separation and purification from *E.coli* using Streamline SP

HUANG Yu-xian, LUO Rong-cheng, DING Xue-mei, ZHENG Da-yong, FANG Yong-xin

Department of Oncology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** **Objective** To optimize the adsorption condition of cation-exchange chromatographic media Streamline SP for separation and purification of anti-HBsAg Fab fragment from *E.coli*. **Methods** The adsorption of the target protein for separation and purification by the cation-exchange chromatographic media Streamline SP was tested using test tube method in balanced buffer solution with different pH values and ion concentrations. The adsorption effect was then verified by cation-exchange chromatography using 1-ml Streamline SP prepacked column and 28-ml Streamline SP self-assembly column. **Results** According to the experiment results of test tube method, the loading buffer with pH of 4.4 and ionic concentration of 100 to 600 mmol/L could achieve optimal target protein adsorption effect by cation-exchange chromatographic media Streamline SP, as verified by cation-exchange chromatography with 1-ml SP prepacked column and 28-ml Streamline SP self-assembly column. **Conclusion** The optimal condition of cation-exchange chromatography selected by test tube method can be applied for separation and purification of anti-HBsAg Fab fragment from *E.coli*.

**Key words:** test tube method; anti-HBsAg Fab; ion-exchange chromatography; purification

离子交换层析的基本反应过程就是离子交换剂平衡离子与待分离物质、缓冲液中离子间的交换,所以在离子交换层析中平衡缓冲液和洗脱液的 pH 和离子强度的选择对于分离效果有很大的影响<sup>[1]</sup>。在离子交换层析缓冲液的 pH 和离子强度的选择中,一般多采用电泳滴定曲线法和试管法来确定<sup>[2]</sup>,但电泳滴定曲线法仅从理论上提供数值,并且实际操作复杂,多数实验室未能开展,而试管法的实验条件与离子交换层析的实验条件较为接近,方法简单,能直观、全面的反映离子交换层析的反应条件<sup>[3]</sup>。根据离子交换层

析原理,平衡缓冲液中适宜的 pH、离子强度能使离子交换介质与目的蛋白充分吸附,通过测定介质在不同 pH 与离子强度的平衡缓冲液条件下,与目的蛋白结合后上清液中目的蛋白浓度,可间接得知介质与目的蛋白充分吸附的最佳 pH 与离子强度<sup>[4]</sup>。抗人乙型肝炎抗原 Fab 片段(anti-HBsAg Fab)是完全人源化基因工程抗体,在慢性乙型肝炎及伴乙型肝炎病毒抗原阳性的肝癌中有重大治疗前景,近年来成为医学工作者研究的热点<sup>[5]</sup>。本文引入了 Pharmacia 提供的试管法来选择及验证 Streamline SP 从大肠杆菌中初步分离纯化 anti-HBsAg Fab 的最适吸附条件,建立了一种简单、直观、快速、高效的层析条件筛选方法,按试管法确定的最佳吸附条件进行离子交换层析纯化目的蛋白,其目的蛋白能充分分离,且能得到较满意的回收率及纯度。

#### 1 材料与方法

收稿日期:2005-11-15

基金项目:国家自然科学基金(39670668)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39670668)

作者简介:黄宇贤(1980-),男,在读硕士研究生,主要研究方向为肿瘤分子靶向治疗,电话:020-87640966,61641651, E-mail: hyx@nfhoc.com

通讯作者:罗荣城,男,南方医科大学南方医院副院长、肿瘤中心主任,教授,博士生导师,中国临床肿瘤学会副秘书长, E-mail: lrc@nfhoc.com

### 1.1 主要试剂及器材

Streamline SP (Pharmacia 公司) anti-HBsAg Fab (本实验室制备) TTBS 封闭液、转移缓冲液(本实验室配制) 辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG(A 博士得生物技术有限公司) DAB 显色液(博士得生物技术有限公司), 其它试剂均为市售国产分析纯。Microcon YM-1 离心过滤器 (Millipore 公司) BCA-100 蛋白质定量试剂盒(申能生物试剂有限公司) 针式 Sephadex G25 柱(Pharmacia 公司)、1 ml SP 预装柱(Pharmacia 公司)。

### 1.2 仪器

5810R 高速低温离心机(Eppendorff 公司)、高速台式离心机(Sigma 公司) AKTA 纯化系统(Amersham/Pharmacia 公司)、THZ-82 型台式恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂) 2010 酶标仪(郑州赛博仪器公司) 752型紫外光栅分光光度计(江苏太仓实验设备厂) SDS-PAGE 垂直蛋白电泳系统及半干 Western blotting 转印系统(Pharmacia 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 最佳吸附 pH 测定 ①待测 pH 定位在 4.0~5.6, 分别为 pH4.0、4.4、4.8、5.2、5.6; 取 5 个 1 ml EP 管, 每管均匀等量加入 0.1 ml Streamline SP 阳离子交换介质; ②各管分别加入 1 ml 0.1 mol/L 不同 pH NaAc-HAc 缓冲液, 混匀稍置沉降后吸弃上清, 如此反复 10 遍使阳离子介质充分平衡各 pH; ③抗体蛋白同样用上述 5 种不同 pH 的缓冲液进行平衡, 取 5 个 Microcon YM-10 超滤离心管分别加入 100  $\mu$ l anti-HBsAg Fab 在储存管内, 同时加入 300  $\mu$ l 不同 pH 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液, 12 000 r/min, 离心 35 min, 弃掉收集管内的滤过液, 于储存管内再加 300  $\mu$ l 不同 pH 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液, 同以上条件离心, 重复 5 次平衡抗体蛋白 pH。④将 Streamline SP 阳离子交换介质与抗体蛋白在 EP 管混合, 手轻轻摇动 5~10 min 使介质与蛋白充分结合; ⑤静置 2 min 待介质完全沉积下来, 取上清液用 BCA 蛋白质定量测定分析试剂盒测定上清中的蛋白含量, 在 2010 型酶标仪上测定其在 570 nm 的 D( $\lambda$ )值。

1.3.2 最佳吸附离子强度测定 ①待测离子强度定位在 0.1~0.8 mol/L, 分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mol/L; 取 8 个 1 ml EP 管, 每管均匀等量加入 0.1 ml Streamline SP 阳离子交换介质; ②在 pH4.4 下, 各管分别加入 1 ml 间隔 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液, 混匀稍置沉降后吸弃上清, 如此反复 10 遍使阳离子介质充分平衡各离子强度; ③抗体蛋白同样用上述 8 种不同离子强度的缓冲液进行平衡, 取 8 个 Microcon YM-10 超滤离心管分别加入 100  $\mu$ l anti-HBsAg

Fab 在储存管内, 同时加入 300  $\mu$ l pH4.4 不同离子强度的 NaAc-HAc 缓冲液, 12 000 r/min, 离心 35 min, 弃掉收集管内的滤过液, 于储存管内再加 300  $\mu$ l 同上的 NaAc-HAc 缓冲液, 离心并重复 5 次以充分平衡抗体蛋白离子强度。④将 Streamline SP 阳离子交换介质与抗体蛋白在 EP 管混合, 手轻轻摇动 5~10 min 使介质与蛋白充分结合; ⑤静置 2 min 待介质完全沉积下来, 取上清液用 BCA 蛋白质定量测定分析试剂盒测定上清中的蛋白含量, 在 2010 型酶标仪上测定其在 570 nm 的 D( $\lambda$ )值。

1.3.3 1 ml SP 预装柱阳离子交换层析 ①按试管法选择的 Streamline SP 阳离子交换介质与 anti-HBsAg Fab 的最适吸附 pH 和离子强度, 平衡缓冲液(loading buffer) 为 pH4.4 0.1 mol/L NaAc-HAc 和洗脱缓冲液(elution buffer)为 pH4.4 0.1 mol/L NaAc-HAc+2 mol/L NaCl。②1 ml SP 预装柱于 AKTA 纯化系统中以 loading buffer 平衡 10 个体积, 流速 1 ml/min。③抗体蛋白 anti-HBsAg Fab 用针式 Sephadex G25 柱平衡为 loading buffer。④在 AKTA 纯化系统上运行自编程序, 流速 1 ml/min, 样品体积 1 ml (含纯品蛋白 anti-HBsAg Fab 2.5 mg) 从样品环中上柱, 上样后以 loading buffer 流洗 5 个体积, 然后采用线性梯度模式以 elution buffer 洗脱, 10 个体积至 100%。⑤收集洗脱峰, 洗脱结束后以 loading buffer 平衡 10 个体积。

1.3.4 小试规模阳离子交换层析 ①1 ml SP 预装柱证实经选定的离子交换层析最佳条件可行后, 自装 28 ml Streamline SP 层析柱, 直接用冻溶超声破菌离心后的上清进行离子交换层析。②使用与 1 ml SP 预装柱相同的平衡液和洗脱液。③于 AKTA 纯化系统中以平衡液平衡 Streamline SP 柱 10 个体积, 流速 2 ml/min。④在 AKTA 纯化系统上运行自编程序, 流速 2 ml/min, 将样品从 AKTA 纯化系统 A 泵中上样, 菌液上清量为 517 ml, 上样后以 loading buffer 流洗 5 个体积, 采用线性梯度模式以 elution buffer 洗脱, 10 个体积至 100%。⑤收集洗脱峰, 洗脱结束后以 loading buffer 平衡 10 个体积。将收集的各吸收峰, 进行 SDS-PAGE 电泳<sup>[6]</sup>及 Western blot 免疫印迹<sup>[7]</sup>。

1.3.5 统计学方法 用 SPSS10.0 软件进行线性回归分析。

## 2 结果

### 2.1 最佳吸附 pH

试管法测定的阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 最佳吸附 pH 结果见图 1。将样品组的平均 D( $\lambda$ ) 值与平均浓度求曲线方程为:  $Y = -35.014 + 1774X$ , 曲线方程表明平均 D( $\lambda$ ) 值与平均

浓度具有曲线线性关系。在样品组 S7~S11 中,随着缓冲液 pH 不同,各组的  $D(\lambda)$ 、浓度会有相应变化。绘制样品组平均  $D(\lambda)$ -浓度曲线后,以样品组 S8 的平均  $D(\lambda)$  值及平均浓度最低,与 S8 相对应的 pH 为 4.4,说明在此条件下目的蛋白与介质之间结合最佳,由此可确定阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 的最佳吸附 pH 为 4.4。

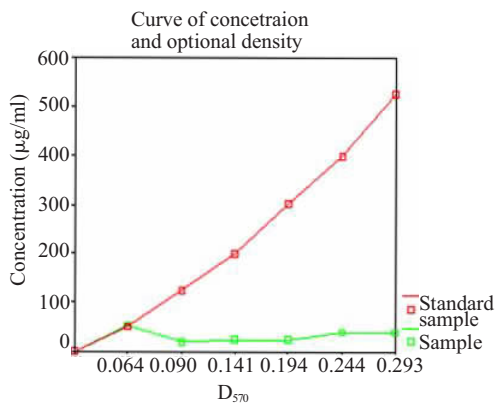


图 1 试管法测定的阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 最佳吸附 pH  
Fig.1 Optimal adsorption pH of cation-exchange chromatographic media Streamline SP and anti-HBsAg Fab determined by test tube method

### 2.2 最佳吸附及洗脱离子强度

试管法测定阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 的最佳吸附离子强度结果见图 2。将样品组平均  $D(\lambda)$  值与平均浓度求曲线方程为： $Y=0.027+0.0005X$ ，曲线方程表明平均  $D(\lambda)$  值与平均浓度具有明显曲线线性关系。在样品组中,随着缓冲液离子强度的不同,各组的  $D(\lambda)$ 、浓度会有相应变化。绘制样品组平均  $D(\lambda)$ -浓度曲线后, S7~S12 的平均  $D(\lambda)$  值与平均浓度均较低,且各值之间基本无差异,与 S7~S12 相对应的离子强度为 100 mmol/L~600 mmol/L,所以确定阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 的最佳吸附离子强度为 100 mmol/L~600 mmol/L。

### 2.3 1 ml SP 预装柱阳离子交换层析结果

试管法选择阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 的最佳吸附条件后,以纯目的蛋白 anti-HBsAg Fab 在 1 ml SP 预装柱阳离子交换层析结果如图 3。图 3 中可见 2 个洗脱峰,分别为  $P_1$ 、 $P_2$ 。 $P_1$  在 19.2%洗脱盐浓度出现,而  $P_2$  在 29%洗脱盐浓度出现。 $P_1$ 、 $P_2$  峰型规整,SDS-PAGE 电泳结果证实  $P_2$  含有目的蛋白,紫外光栅分光光度计测两个峰  $D_{280}$  处吸收峰后,计算得出上样前与上样后目的蛋白浓度基本相等(上样前为 2.5 mg/1ml,上样后约等于 2.4

mg/1ml),说明目的蛋白与介质能充分吸附,试管法选择的最佳吸附条件在小量纯品试验中切实可行。

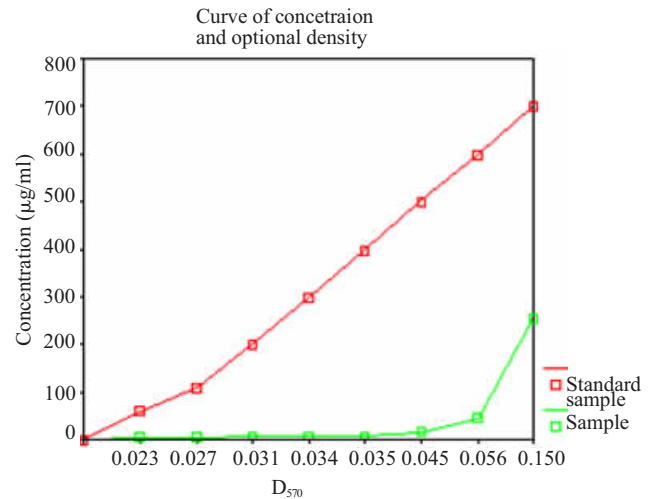


图 2 试管法测定阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 的最佳吸附离子强度  
Fig.2 Optimal adsorption ion concentration of cation-exchange chromatographic media Streamline SP and anti-HBsAg Fab determined by test tube method

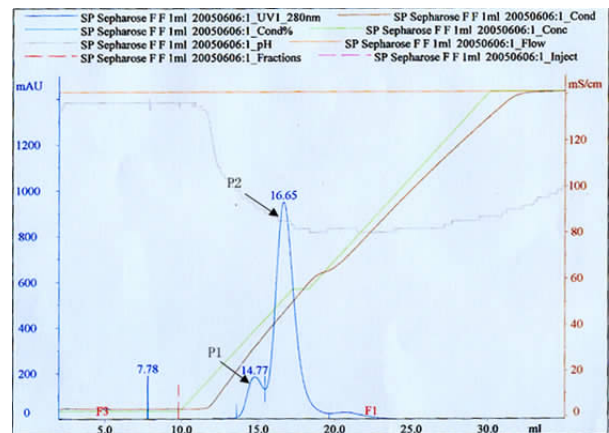


图 3 1 ml SP 预装柱阳离子交换层析结果  
Fig.3 Effect of cation-exchange chromatography with 1 ml SP prepacked column

### 2.4 小试规模离子交换层析结果

小试规模阳离子交换层析结果如图 4。图 4 可见 2 个洗脱峰,分别为  $P_1$ 、 $P_2$ 。上样过程有较高吸收峰,  $D_{280}$  最高达 3050 mAU,  $D_{260}$  值最高达 4830 mAU, SDS-PAGE 电泳结果证实流穿液中未见目的蛋白,估计可能为核酸及杂质蛋白。 $P_1$  在 8%洗脱盐浓度出现,经 SDS-PAGE 电泳证实相对分子质量为 30 000 的蛋白为主,与目的蛋白相对分子质量接近,性质不明。 $P_2$  在 18%洗脱盐浓度出现,SDS-PAGE 电泳证实相对分子质量 25 000,行 Western blotting 实为目的蛋白。



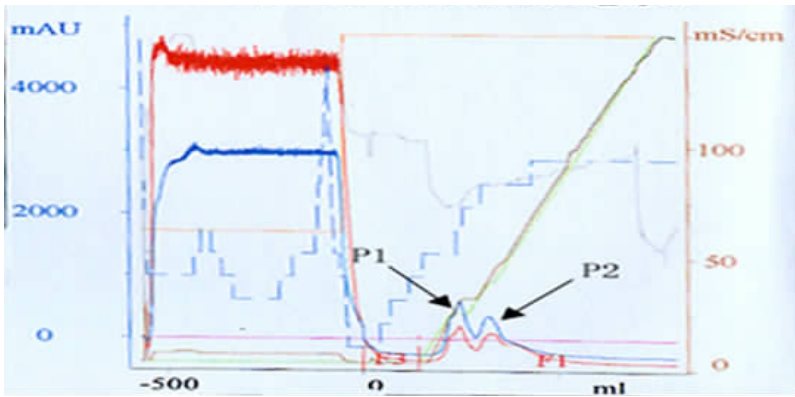


图 4 小试规模离子交换层析结果

Fig.4 Effect of cation-exchange chromatography of bench scale

### 2.5 目的蛋白定性

将小试规模  $P_2$  洗脱峰进行 SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 结果如图 5、6。从图 5 结果得知,小试规模的  $P_2$  在纯目的蛋白相对应处出现浅色条带,从 Western blotting 结果图 6 证实为 anti-HBsAg Fab 目的蛋白。

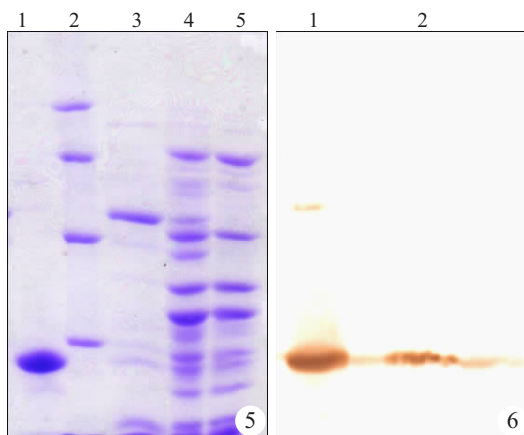


图 5 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.5 SDS-PAGE result of the separated protein

Lane 1: Purified anti-HBsAg Fab ( $M_r=25000$ ); Lane 2: Protein marker; Lane 3:  $P_2$  supernatant of bench scale; Lane 4: Sample supernatant; Lane 5: Elution supernatant

图 6 Western Blot 免疫印迹法

Fig.6 Western blotting of the separated protein

Lane 1: Purified anti-HBsAg Fab ( $M_r=25000$ ); Lane 2:  $P_2$  supernatant of bench scale

### 3 讨论

合适的离子交换层析条件直接关系到整个目的蛋白的分离纯化效果,在离子交换层析条件的选择中,缓冲液的 pH、离子强度的选择首先要保证各个待分离物质的稳定,其次是要使各个待分离物质与离子交换介质有适当的结合,并尽量使待分离样品和杂质

与离子交换介质的结合有较大的差别<sup>[8]</sup>。在阳离子交换层析纯化条件的选择中,本文引入了 Pharmacia 公司提供的试管法来选择阳离子交换层析介质 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 的最佳吸附条件,并在此方法的操作过程中新增了原纯品目的蛋白缓冲液的置换步骤,即利用微量离心过滤器将原纯品目的蛋白缓冲液体系置换成离子交换层析缓冲液体系(在这个试验中为 NaAc-HAc 缓冲液体系),使得原有纯品缓冲液体系的置换更加方便,也让试管法更加微量化、精确化、适应范围更广。作者开始便选择了 Streamline SP 作为离子交换层析介质是因为目的蛋白较稳定,可以选择强交换介质,而强阳离子交换基团在很广的 pH 范围内能够始终保持离子化状态,这有利于在离子交换过程中吸附 pH 及离子强度范围的选择,这一点对于尚未知目的分子等电点的分离尤其重要<sup>[9]</sup>。Streamline SP 虽然提供了广泛的吸附 pH 选择范围,但对于不同目的蛋白分离纯化在具体哪个 pH 范围之内才能达到最佳吸附效果却需要实验摸索确定<sup>[10]</sup>。作者将 NaAc-HAc 缓冲液 pH 预设 4.0~5.6 之间,离子强度预设 100~800 mmol/L 之间,其主要根据:(1)pcGene 软件计算出目的蛋白理论等电点为 7.05,在 pH 为 4.0~5.6 的缓冲液中,目的蛋白有较好的吸附效果。(2)离子强度的选择是根据目的蛋白的理化特性和 Streamline SP 提供的离子强度范围而定,并且离子交换层析的平衡缓冲液通常采用较低盐浓度的缓冲液。经试管法验证后,缓冲液最佳吸附 pH 和最佳吸附离子强度均落在预设范围之内<sup>[11]</sup>。另外,经试管法确定最佳吸附离子强度为 100~600 mmol/L,作者最后选定 100 mmol/L 离子强度作为缓冲液的最佳吸附离子强度,是因为如图 2 所示,在 100~600 mmol/L 离子强度范围内,平均  $D(\lambda)$  值与平均浓度均较低且各值之间基本无差异,以 100 mmol/L 作为平衡缓冲液的离子强度已经能够达到理想的吸附效果,同时也方便缓冲液配制及减少试剂消耗。如果离子强度选定在试管法确定的最佳吸附离子强度的最高值,即 600 mmol/L,有可能削弱目的蛋白与介质的静电作用从而影响目的蛋白载量,并造成试剂不必要的浪费<sup>[11]</sup>。确定 Streamline SP 与 anti-HBsAg Fab 最佳吸附 pH 为 4.4、离子强度为 100 mmol/L 后,在此条件进行实际操作,1 ml SP 预装柱证实了试管法选定的吸附条件是适宜的,并且上样前与上样后纯目的蛋白量基本相等,说明在此条件下目的蛋白回收率较高。经过

大量粗样品上样,证实在此最佳吸附条件下,目的蛋白能较好的分离。此吸附条件的确定为下一步层析纯化工艺组合路线奠定了实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Selkirk C. Ion-exchange chromatography [J] Methods Mol Biol, 2004, 244(1): 25-32.
- [2] 陈枢青, 韩晓旭. 利用电泳滴定曲线选择多核苷酸磷酸化酶快速离子交换层析的最佳条件[J] 中国现代应用药学杂志, 1999, 2(16): 34-6.
- Chen SQ, Han XX. Use of electrophoretic titration curve for prediction optimal chromatographic conditions for purification of polynucleotide phosphorylase by fast ion-exchange chromatography [J] Chin Mod Appl Pharm, 1999, 2(16): 34-6.
- [3] 赵德明, 蔡德鸿, 张华, 等. 试管法纯化人胰岛细胞的初步研究[J] 广东医学, 2004, 25(2): 136-7.
- Zhao DM, Cai DH, Zhang H, et al. Preliminary study on the purification of human islet cells by tube method [J] Guangdong Med J, 2004, 25(2): 136-7.
- [4] 李津, 俞泳霖, 董德祥. 生物制药设备和分离纯化技术[J] 北京: 化学工业出版社, 2003, 232-40.
- [5] 郑大勇, 罗荣城, 蔡红兵. 基因工程抗体 anti-HBsAg Fab 原核表达体系大规模培养条件的实验研究[J] 第一军医大学学报, 2005, 24(5): 517-20.
- Zheng DY, Luo RC, Cai HB. Conditions for large-scale production of genetically engineered *E.coli* bearing humanized anti-HBsAg Fab [J] J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2005, 24(5): 517-20.
- [6] 郭尧君. 蛋白电泳实验技术[M] 北京: 科学出版社, 1999: 123-57.
- [7] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M] 北京: 科学出版社, 1998: 366-73.
- [8] Stepnowski P, Mrozik WW. Analysis of selected ionic liquid cations by ion exchange chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography[J] Science, 2005, 28(2): 149-54.
- [9] Malumquist G, Lundell N. Characterization of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion-exchange chromatography of proteins and peptides chromatography [J] J Chromatogr, 1992, 627(1-2): 107-24.
- [10] 浦宇, 王芝祥. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况[J] 生物工程学报, 2004, 20(6): 214-22.
- Pu Y, Wang ZX. Advancement of ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography media application in protein chromatography[J] J Bioeng, 2004, 20(6): 214-22.
- [11] 李校堃, 袁辉. 药物蛋白质分离纯化技术[M] 北京: 化学工业出版社, 2005: 130-1.

#### (上接 408 页)

#### 参考文献:

- [1] Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies [J] Anticancer Res, 2004, 24(5A): 2783-40.
- [2] Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells [J] Blood, 1998, 92(3): 996-1002.
- [3] Bernhard D, Tinhofer I, Tonko M, et al. Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells [J] Cell Death Differ, 2000, 7(9): 834-42.
- [4] Delmas D, Rebe C, Lacour S, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells [J] J Biol Chem, 2003, 278(42): 41482-90.
- [5] Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, et al. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpain [J] FASEB J, 2004, 18(12): 1395-7.
- [6] Blattner JR, He L, Lemasters JJ. Screening assays for the mitochondrial permeability transition using a fluorescence multiwell plate reader [J] Anal Biochem, 2001, 295(2): 220-6.
- [7] Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, et al. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells [J] Cancer Res, 2001, 61(12): 4731-9.
- [8] Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, et al. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2 [J] FASEB J, 2001, 15(9): 1613-5.
- [9] Zheng J, Ramirez VD. Piceatannol, a stilbene phytochemical, inhibits mitochondrial F0F1-ATPase activity by targeting the F1 complex [J] Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(2): 499-503.
- [10] Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Involvement of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) cells [J] Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(3): 579-85.
- [11] Mohamad N, Gutierrez A, Nunez M, et al. Mitochondrial apoptotic pathway [J] Biocell, 2005, 29(2): 149-61.
- [12] Hail N Jr. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer [J] Apoptosis, 2005, 10(4): 687-705.
- [13] Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization [J] J Cell Sci, 2005, 118(3): 473-83.