

不同来源 Lfcin 诱导 Jurkat 细胞凋亡的对比研究

赵宁¹, 许晓曦¹, 王静¹, 张艳杰², 张书义³

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 上海晨冠乳业有限公司, 上海 201401)

(3. 全国畜牧总站, 北京 100125)

摘要: 本文以牛乳铁蛋白 LfcinB 和人乳铁蛋白 LfcinH 为研究对象, 研究其通过降低线粒体膜电位抑制 Jurkat 细胞增殖效果及两者的差异性。采用 MTT 法检测 LfcinB 和 LfcinH 对 Jurkat 细胞增殖影响; Hoechst33258 染色法荧光显微镜观察 Jurkat 细胞核的变化; 运用 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术将 LfcinB 和 LfcinH 促进 Jurkat 细胞凋亡的阶段进行区分; JC-1 染色激光共聚焦显微镜观察细胞线粒体膜电位的改变。结果显示: LfcinH 和 LfcinB 对 Jurkat 细胞有显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性; 经 LfcinB 和 LfcinH 处理后的 Jurkat 细胞在荧光显微镜下均可见细胞核皱缩、碎裂呈凋亡特征; 激光共聚焦显微镜观察到 Jurkat 细胞线粒体膜电位下降; 流式细胞术检测发现 Jurkat 细胞经 LfcinB 和 LfcinH 处理 48 h 时主要发生早期凋亡。研究结果表明: Jurkat 细胞凋亡的机制可能是通过影响线粒体膜电位导致 Jurkat 细胞凋亡并抑制细胞增殖; 当两者浓度小于 $250 \mu\text{g/mL}$ 时 LfcinH 对 Jurkat 细胞抑制效果较强, 浓度大于 $250 \mu\text{g/mL}$ 时两者对 Jurkat 细胞抑制效果相近。

关键词: 人乳铁蛋白; 牛乳铁蛋白; Jurkat 细胞; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

文章编号: 1673-9078(2014)9-20-25

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.004

Apoptosis in Jurkat Cells Induced by Lfcin from Different Sources

ZHAO Ning¹, XU Xiao-xi¹, WANG Jing¹, ZHANG Yan-jie², ZHANG Shu-yi³

(1. College of Food Science Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China) (2. Shanghai Chen Guan Dairy Co., Ltd, Shanghai 201401, China) (3. National Animal Husbandry Service, Beijing 100125, China)

Abstract: In this study, the inhibitory effects of bovine lactoferricin (LfcinB) and human lactoferricin (LfcinH) on the proliferation of Jurkat cells were explored and compared, by reducing the mitochondrial membrane potential in the cells. The effect on Jurkat cell proliferation was measured by MTT assay, and nuclear changes were observed by fluorescence microscopy with Hoechst 33258 staining. A flow cytometry of double-labeling by Annexin V-FITC/PI was used to distinguish the apoptosis stages in the Jurkat cells that were induced by LfcinH and LfcinB. The results showed that LfcinB and LfcinH significantly inhibited the proliferation of Jurkat cells ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. A decreased mitochondrial membrane potential in Jurkat cells was observed by JC-1 staining using laser scanning confocal microscopy. The early phase of apoptosis occurred after Jurkat cells were treated by LfcinH and LfcinB for 48 h; characteristics of apoptosis such as nuclear shrinkage and debris were observed using fluorescence microscopy. The results suggest that the change in mitochondrial membrane potential may have led to apoptosis in Jurkat cells and, eventually, the inhibition of proliferation. When the concentration of both, LfcinH and LfcinB was less than $250 \mu\text{g/mL}$, the inhibitory effect of LfcinH on Jurkat cells was noted to be stronger; whereas at concentrations higher than $250 \mu\text{g/mL}$, LfcinH and LfcinB showed similar inhibitory effects.

Key words: LfcinH; LfcinB; Jurkat cell; cell apoptosis; mitochondrial membrane potential

乳铁蛋白 (Lactoferricin, 简称为 Lfcin) 是乳铁蛋白在酸性环境下经胃蛋白酶水解产生的一段多肽^[1], 可在肠道中被释放并发挥其相应的生理功能。乳铁蛋白与乳铁蛋白的功能密切相关, 除不能结合铁离子外, Lfcin 具备乳铁蛋白的抗病毒、抗菌、抑制癌

收稿日期: 2014-03-02

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2013BAD18B06); 国家“2011” 计划“食品安全与营养协同创新中心”

作者简介: 赵宁 (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 许晓曦 (1968-), 女, 教授, 研究方向: 乳品科学与技术

细胞增殖、及参与免疫反应^[1]等所有生物学活性。牛乳铁蛋白 (Bovine Lactoferricin, 简称 LfcinB) 来源广泛、分子量小、性能稳定, 具有较强的生物活性^[2], 而人乳铁蛋白 (Human Lactoferricin, 简称 LfcinH) 来源特殊研究较少, 国内外对其主要针对免疫调节方面进行研究, 但抗肿瘤方面的研究尚少报道, 因此 LfcinB 和 LfcinH 成为了最重要的研究对象, 其来源主要是牛乳和母乳中提取的一种天然物质, 毒副作用小, 安全可靠, 它们的一级结构已确定, LfcinB 是牛乳铁蛋白 N 端 17~41 位的氨基酸组成^[1] 分子量为 3100 kD

(见图1)。LfcinH来源于人乳铁蛋白的1~49位氨基酸^[4]，其长度为LfcinB的2倍，分子量为5738 kD，其一级结构与LfcinB相似，均是由二硫键连接成为一个分子，呈环状结构(见图2)。



图1 LfcinB的一级结构^[1]

Fig.1 Primary structure of LfcinB

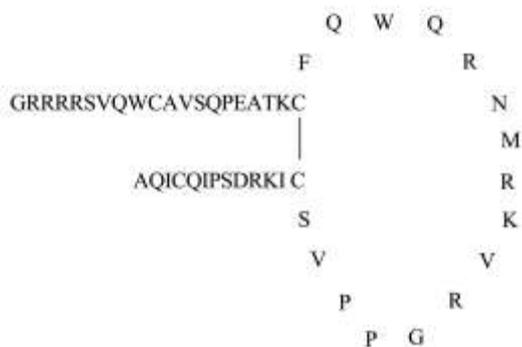


图2 LfcinH的一级结构^[4]

Fig.2 Primary structure of LfcinH

以往有研究表明，LfcinB对许多肿瘤细胞系有细胞毒作用，能够抑制人白血病细胞增殖，但对正常淋巴细胞、成纤维细胞活性无任何影响，呈现出一定的针对性^[5-6]，LfcinH也能够抑制肿瘤生长^[7-8]，但尚未有LfcinH对人血癌细胞抑制作用的报道。基于LfcinH拥有与LfcinB相同的区域，却并未有报道将两者的抗肿瘤性质进行比较，本研究选用从人急性淋巴细胞白血病患者的外周血中提取的一种Jurkat T细胞，属人T淋巴细胞系肿瘤细胞，常用于研究T细胞生物学行为的体外模型^[9]，以此来验证LfcinB和LfcinH对Jurkat细胞凋亡过程中线粒体膜电位的变化(mitochondrial membrane potential MMP)探讨其作用机制，采用流式细胞术分析两种来源乳铁蛋白素抑制作用的差异和相关性，为来源广泛的LfcinB取代昂贵的LfcinH提供实验数据，并为进一步深入研究乳铁蛋白素在临床医学方面的开发及其在食品中的应用提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Jurkat, Clone E6-1人T淋巴细胞白血病细胞(细胞编号TIB-152购自ATCC公司(American Type Culture Collection, USA))。LfcinB(氨基酸序列FKCRRWQWRMCKLGAPSITCVRRAF)和LfcinH(氨基酸序列GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA)购自上海楚肽生物有限公司，RPMI1640完全培养基购自Solarbio科技有限公司，胎牛血清购自杭州四季清，DMSO购自Sigma，MTT试剂盒，购自Thermo公司，RPMI1640培养基，雷帕霉素(RAPA)，Hoechst 33258试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)购自Beyotime生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将Jurkat细胞在RPMI1640培养基中培养，分别补充链霉素100 U/mL、青霉素100 U/mL、L-谷氨酸2 mmol/L、10%热灭活胎牛血清(RPMI1640完全培养基)，细胞培养箱37℃、5% CO₂，培养箱底部添加500 mL左右的超纯水，使细胞培养箱内部空气潮湿。细胞用培养瓶一周2次传代或保持最佳生长状态。将实验对象分为三组，给药组：将Jurkat细胞在含有一定浓度梯度的LfcinB和LfcinH(分别为100、150、200、250和300 μg/mL)完全培养基中培养。空白对照组：零添加LfcinB和LfcinH的Jurkat细胞，阳性对照组：100 nmol/mL雷帕霉素(RAPA)的药物刺激Jurkat细胞。

1.2.2 MTT法检测LfcinB和LfcinH对Jurkat细胞增殖的影响

本实验设置分成四组，分别为给药组，阳性对照组，空白对照组(仅含有RPMI-1640培养，无细胞悬液)，对照组(含有细胞悬液未经LfcinB和LfcinH处理)。细胞以1×10⁴个/mL密度接种于96孔培养板中，每孔100 μL细胞悬液，分别培养24 h、48 h、72 h后，每孔加入MTT 10 μL，混匀，37℃孵育4 h，弃去上清液，然后每孔加入100 μL DMSO，立即用酶标仪490 nm波长测定各孔的吸光值，每组设3个复孔，记录结果。计算细胞增殖抑制率，采用SPSS 19.0进行统计分析。

$$\text{抑制率} / \% = [(\text{对照组} - \text{空白组}) - (\text{给药组} - \text{空白组})] / (\text{对照组} - \text{空白组}) \times 100\%$$

1.2.3 Hoechst33258染色法观察Jurkat细胞核的变化

根据 MTT 实验结果, 选用 LfcinB 和 LfcinH 最适浓度为实验组, 并设置空白组。处理 Jurkat 细胞 24 h 后, 将细胞浓度调至 1×10^6 个/mL, 离心收集细胞, 加入 0.5 mL 固定液, 固定 10 min。离心去固定液, 用 PBS 洗两遍。最后一次离心后吸去一部分液体保留约 50 μ L 液体, 滴加至载玻片上, 稍晾干, 均匀滴上 0.5 mL Hoechst33258 染色液, 染色 5 min, 微晾干。再用 PBS 洗两遍, 滴一滴抗荧光淬灭封片液, 盖上盖玻片, 立即进行荧光显微镜检测。

1.2.4 Annexin-FITC/PI双标记流式细胞计数检测细胞凋亡

同理选用 LfcinB 和 LfcinH 最适浓度为实验组, 并设置空白组, 分别处理 Jurkat 细胞 24 h、48 h、72 h 后, 将细胞浓度调至 1×10^6 个/mL, 离心弃上清, 收集细胞用预冷 PBS 洗涤, 离心弃上清液, 加 195 μ L 的 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 轻轻混匀, 室温避光孵育 60 min, 离心弃上清, 加入 190 μ L 的 Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 再加入 10 μ L 碘化丙啶, 立即进行流式细胞仪检测细胞凋亡状况。

1.2.5 JC-1标记法检测Jurkat细胞线粒体膜电位的变化

选用LfcinB和LfcinH最适浓度为实验组, 并设置空白组。处理Jurkat细胞24 h后, 调细胞浓度至 1×10^6 个/mL, 离心弃上清液, 收集细胞重悬于0.5 mL细胞培养液中, 加入0.5 mL JC-1染色工作液, 在细胞培养箱中孵育20 min, 离心弃上清液, 加1 mL JC-1缓冲液冲洗2次, 再加入适量的JC-1缓冲液重悬后, 立即用激光共聚焦显微镜观察。

1.2.6 统计方法

实验重复3次, 每次设置3个平行样。实验的数据均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 MTT法检测 LfcinB 和 LfcinH 对 Jurkat 细胞增殖抑制作用

LfcinB 和 LfcinH 对 Jurkat 细胞增殖的抑制如图 3 所示, 均有一定的抑制作用, 随着 LfcinB 和 LfcinH 浓度的增加, Jurkat 细胞增殖抑制率随之增高, 并且

随着作用时间的延长, 增殖抑制率也逐渐增强。呈剂量和时间依赖性。此外, 作用时间相同时, 实验组浓度为 250 μ g/mL~300 μ g/mL 的 LfcinB 与浓度为 150 μ g/mL~300 μ g/mL 的 LfcinH 对 Jurkat 细胞增殖影响差异不大, 当两者浓度小于 250 μ g/mL 时 LfcinH 对 Jurkat 细胞增殖抑制效果较好, 浓度大于 250 μ g/mL 时两者的抑制效果相近, 并且浓度为 250 μ g/mL 的 LfcinB 与浓度为 150 μ g/mL 的 LfcinH 对 Jurkat 细胞的增殖影响差异不大, 因此, 选此浓度作为本研究的最适浓度。

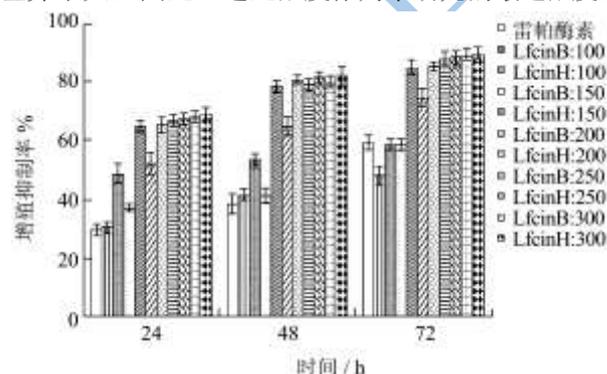


图3 不同浓度的LfcinB和LfcinH对Jurkat细胞增殖的影响

Fig.3 The effects of different concentrations of LfcinB and LfcinH on the proliferation of Jurkat cells

注: n=3; 实验组与空白对照组(0)比较, $P < 0.05$ 。

2.2 荧光显微镜观察细胞核变化

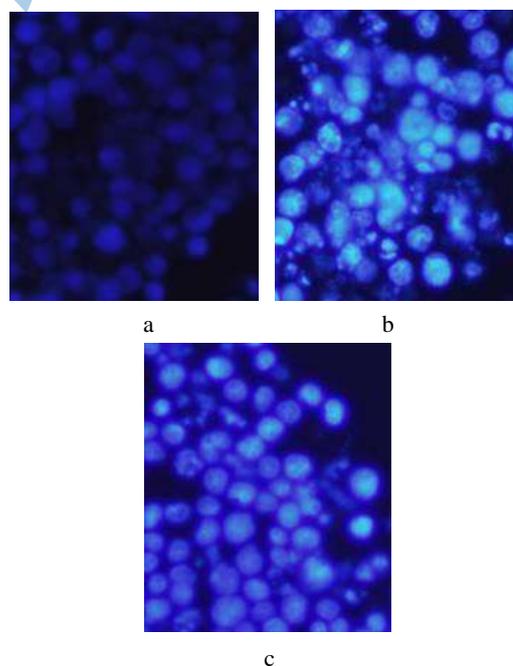


图4 LfcinB和LfcinH对Jurkat细胞核的影响($\times 400$)

Fig.4 The effects of LfcinB and LfcinH on Jurkat cell nucleolus

注: a: 空白组, b: LfcinB:250 μ g/mL, c: LfcinH:150 μ g/mL。

用 Hoechst33258 染料对细胞核染色可区分凋亡

与正常的 Jurkat 细胞。通过荧光显微镜观察到未经乳铁蛋白处理的细胞核(图 4a)呈均匀染色,形态完整,呈淡蓝色;而经 LfcinB 和 LfcinH 处理 24 h 后的细胞核带有荧光的深蓝色,染色质发生高度固缩、破裂,呈碎片状(图 4b、4c),呈典型的凋亡特征。形态学结果表明, LfcinB 和 LfcinH 可诱导 Jurkat 细胞凋亡。

2.3 流式细胞仪检测 Jurkat 细胞的凋亡率

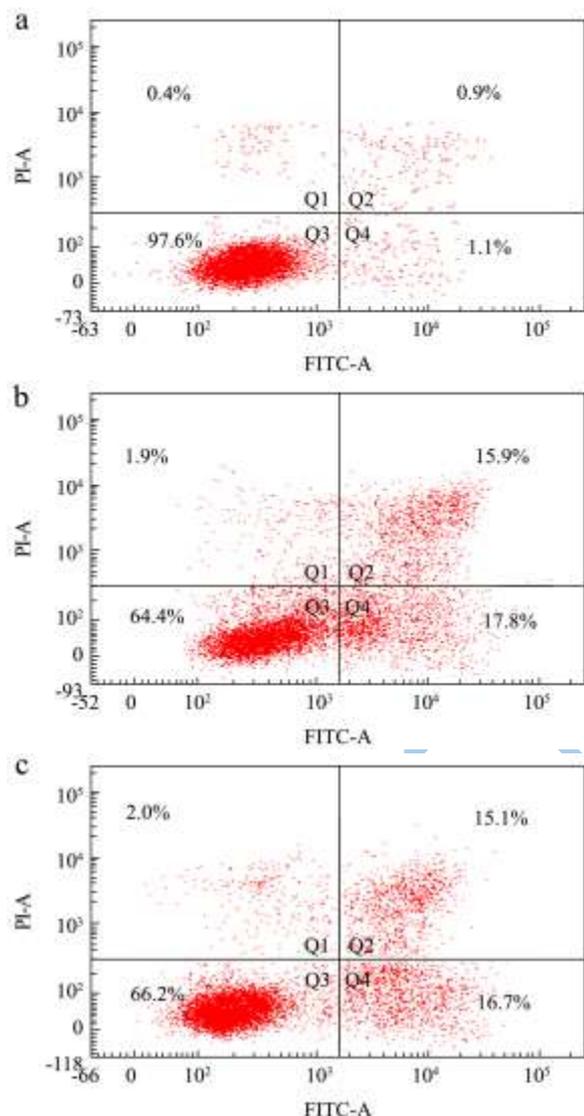


图 5 LfcinB 和 LfcinH 处理 Jurkat 细胞 24 h 检测的凋亡率
Fig.5 The apoptosis rate of Jurkat cells treated with LfcinB and LfcinH for 24 h

注: a: 空白组; b: LfcinB:250 μg/mL; c: LfcinH:150 μg/mL。

运用 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术将 LfcinB 和 LfcinH 促进 Jurkat 细胞凋亡的阶段进行区分是常用的方法。对于同等浓度的 LfcinB 与 LfcinH 接触 Jurkat 细胞不同时间的早期凋亡率来说, LfcinB 和 LfcinH 处理 Jurkat 细胞 24 h 时凋亡效果并不明显(图

5), 48 h 时 Jurkat 细胞主要发生早期凋亡(图 6)。48 h 以后 Jurkat 细胞主要发生是晚期凋亡或细胞坏死(图 7)。如图可知浓度为 250 μg/mL 的 LfcinB 和浓度为 150 μg/mL 的 LfcinH 促进 Jurkat 细胞凋亡率接近, 进一步表明此浓度可以作为研究凋亡机制的最适浓度。

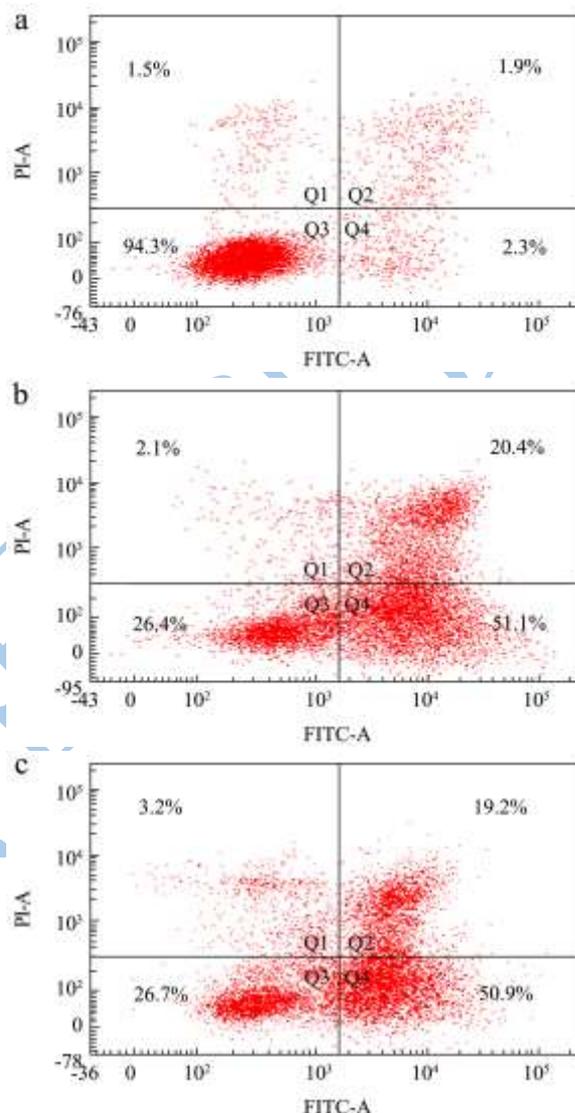


图 6 LfcinB 和 LfcinH 处理 Jurkat 细胞 48 h 检测的凋亡率
Fig.6 The apoptosis rate of Jurkat cells treated with LfcinB and LfcinH for 48 h

注: a: 空白组; b: LfcinB:250 μg/mL; c: LfcinH:150 μg/mL。

2.4 激光共聚焦显微镜观察 Jurkat 细胞中线粒体膜电位的变化

细胞的凋亡与线粒体膜电位(MMP)的下降密切相关,线粒体是细胞发生凋亡的调控中心,线粒体在细胞凋亡的发生中起重要作用, MMP 下降也是细胞凋亡的早期特异性标志指标之一, MMP 的下降发生在细胞核凋亡特征出现之前一旦 MMP 崩溃,则细

胞凋亡不可逆转^[10]，本实验选用一种亲脂性的阳离子荧光染料 JC-1 进行染色，是线粒体膜电位的理想荧光探针^[11]，可结合到线粒体基质，并能够精确区分线粒体膜电位的高低；在低膜电位的线粒体内，JC-1 以单体形式存在，发射出绿色荧光（527 nm）当膜电位升高时，JC-1 形成聚合体而发射出橙红色荧光（590 nm）。

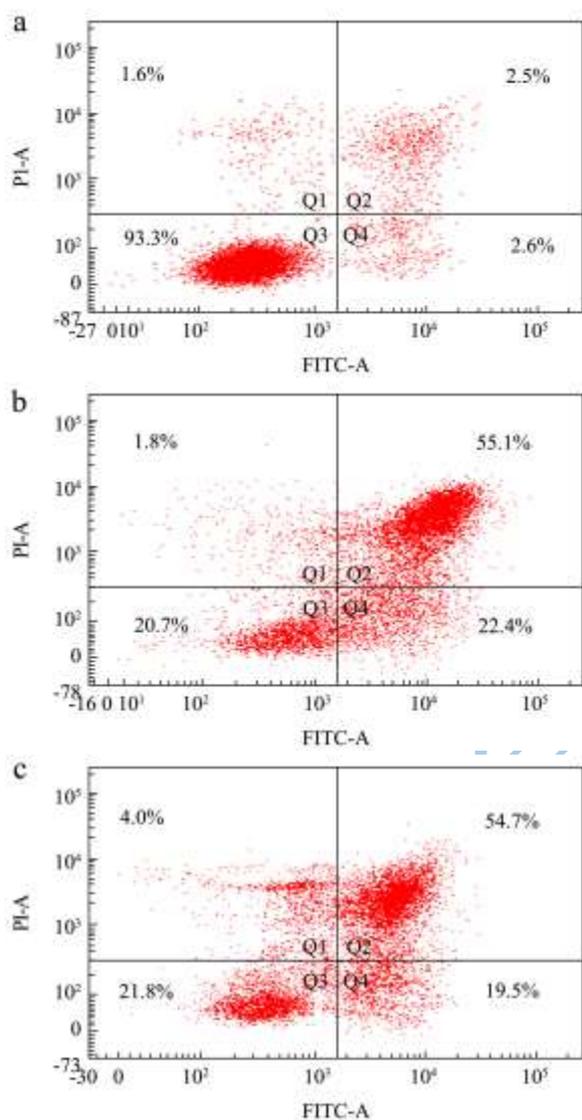


图7 LfcinB 和 LfcinH 处理 Jurkat 细胞 72 h 检测的凋亡率
Fig.7 The apoptosis rate of Jurkat cells treated with LfcinB and LfcinH for 72 h

注：a：空白组；b：LfcinB:250 μg/mL；c：LfcinH:150 μg/mL。

激光共聚焦显微镜可直观的观察空白组的细胞发出橙红色荧光（图 8a）；而经 LfcinB 和 LfcinH 处理 24 h 后的细胞发出绿色荧光（图 8b、8c），这种橙红色荧光到绿色荧光转变的结果表明 Jurkat 细胞线粒体膜电位下降，LfcinB 和 LfcinH 可通过降低线粒体膜电位诱发 Jurkat 细胞凋亡。

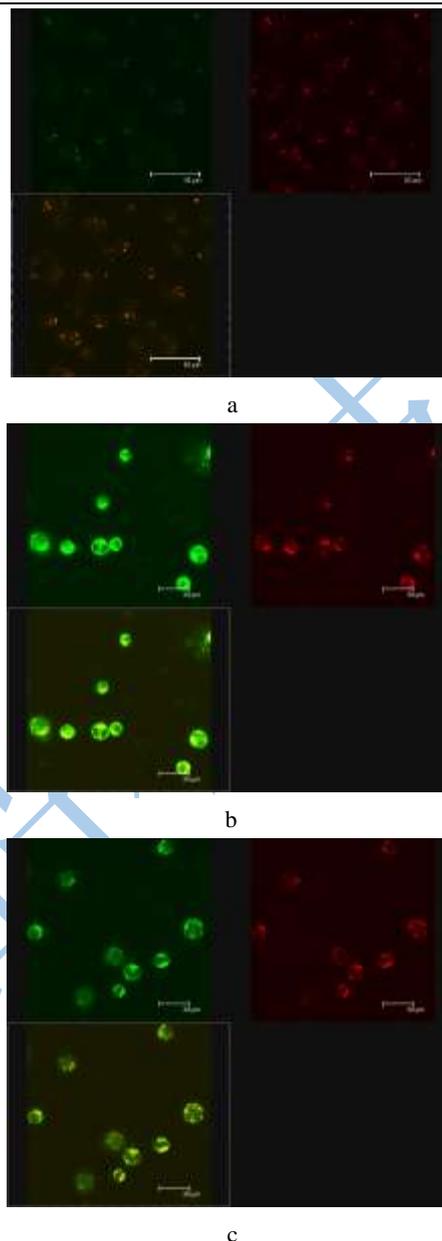


图8 LfcinB 和 LfcinH 对 Jurkat 细胞线粒体膜电位的影响(物镜×40)

Fig.8 The effects of LfcinB and LfcinH on Jurkat cell MMP

注：a：空白组；b：LfcinB:250 μg/mL；c：LfcinH:150 μg/mL。

3 结论

3.1 本实验以人工合成的牛乳铁蛋白素（LfcinB）和人乳铁蛋白素（LfcinH）为研究对象，采用 MTT 法发现 LfcinB 和 LfcinH 均对人 T 淋巴细胞系肿瘤细胞（Jurkat）有明显的抑制作用，且抑制作用呈剂量效应关系，其中浓度大于 250 μg/mL 的 LfcinB 与浓度大于 150 μg/mL 的 LfcinH 对 Jurkat 细胞增殖抑制率差异不大。因此选取 LfcinB 和 LfcinH 浓度分别为 250 μg/mL、

150 $\mu\text{g/mL}$ 作用 Jurkat 细胞, 从细胞核的变化、检测细胞凋亡率以及细胞中线粒体膜电位的改变情况来观察 LfcinB 和 LfcinH 抑制 Jurkat 细胞增殖可能存在的作用机制。

3.2 通过荧光显微镜观察发现, 经LfcinB和LfcinH处理后的Jurkat细胞出现细胞核皱缩、破裂呈碎片等现象具有凋亡形态特征。Annexin-FITC/PI双标记流式细胞仪检测结果显示, 经LfcinB和LfcinH处理Jurkat细胞48 h后的细胞凋亡率明显高于24 h, 并48 h时主要通过促进Jurkat细胞早期凋亡实现的抑制其增殖的效果, 48 h以后主要是促进Jurkat细胞晚期凋亡或细胞坏死来实现。激光共聚焦显微镜观察到Jurkat细胞线粒体膜电位明显下降, 上述实验结果表明, LfcinB和LfcinH能够抑制Jurkat细胞增殖, 推断其机制可能是通过降低Jurkat细胞线粒体膜电位诱导细胞凋亡来实现抑制细胞增殖的作用, 这与前期研究^[5-6]发现LfcinB对Jurkat细胞作用时, LfcinB能引起Jurkat细胞线粒体膜位下降, 通过依赖caspase家族的细胞内信号通路诱导Jurkat 细胞凋亡的结果相一致。

3.3 本研究发现两者浓度小于250 $\mu\text{g/mL}$ 时LfcinH对Jurkat细胞增殖抑制效果较好, 与国外报道相一致, Bodil^[12-13]等人最近研究表明, 通过LfcinB小分子肽与肿瘤细胞表面的硫酸类肝素、硫酸软骨素等大分子相结合, 从而阻止了其与肿瘤细胞膜的接触, 降低了其抗肿瘤活性, 因此推断LfcinH分子较大不仅与肿瘤细胞表面大分子充分结合, 还能够与肿瘤细胞膜接触, 导致细胞凋亡, 具体的机制尚不明确, 有待进一步研究。两者浓度大于250 $\mu\text{g/mL}$ 时对Jurkat细胞均具有明显的抑制效果, 且差异不大。原因大致有两种: 一是由于两者浓度较高能充分与Jurkat细胞膜接触, 从而明显的抑制细胞增殖, 二是LfcinB和LfcinH在N区都存在共同的环状结构, 具有相同的区域, 结构相似, 因此导致两者对Jurkat细胞抑制效果相近, 这与国外的一些报道相符^[14]。

3.4 Lfcin可以成为易被患者接受的天然的凋亡诱导剂, 占有防治血癌的优势, 但LfcinH分子量大、肽链长、来源特殊、生产较困难, 而LfcinB成本低、性能稳定、生物活性强, 本研究为LfcinB取代肽链复杂的LfcinH提供了理论依据, 生产小肽LfcinB比LfcinH更节约成本。目前, 在欧洲和日本商业化生产中, 乳铁蛋白已应用到制造母乳化婴儿奶粉和食品中, 鉴于乳铁蛋白具备乳铁蛋白功能性质, 实现此类小肽的工业化生产在临床医学方面与食品中显示出良好的应用前景和开发潜力。

参考文献

- [1] Haney E F, Nazmi K, Bolscher J G M, et al. Structural and biophysical characterization of an antimicrobial peptide chimera comprised of lactoferricin and lactoferrampin [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2012, 1818(3): 762-775
- [2] 冯兴军, 王建华, 杨雅麟, 等. 乳铁蛋白肽(Lactoferricin)作用机制研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(1): 23-26
FENG Xing-jun, WANG Jian-hua, YANG Ya-lin, et al. A review of researches on the mechanism of lactoferricin action [J]. *China Biotechnology*, 2004, 24(1): 23-26
- [3] Legrand D, Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity [J]. *Biomaterials*, 2010, 23(3): 365-376
- [4] Hunter H N, Demcoe A R, Jessen H, et al. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(8): 3387-3395
- [5] Mader J S, Salsman J, Conrad D M, et al. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines [J]. *Mol. Cancer Ther.*, 2005, 4(4): 612-624
- [6] 张铁男, 杨巍, 刘宁. 牛乳铁蛋白素对 Jurkat 细胞和 HFL-I 细胞生物学特性的影响[J]. *营养学报*, 2009, 31(5): 465-470
ZHANG Tie-nan, YANG Wei, LIU Ning, et al. Impact of bovine lactoferricin on biological features in jurkat leukemia cells and HFL-I cells [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2009, 31(5): 465-470
- [7] Li WY, Li QW, Han ZS, et al. Growth suppression effects of recombinant adenovirus expressing human lactoferrin on cervical cancer in vitro and in vivo [J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2011, 26(4): 477-483
- [8] Wang J, Li Q, Ou Y, et al. Inhibition of tumor growth by recombinant adenovirus containing human lactoferrin through inducing tumor cell apoptosis in mice bearing EMT6 breast cancer [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2011, 34(6): 987-995
- [9] Roszak J, Smok-Pieniżek A, Nocuń M, et al. Characterization of arsenic trioxide resistant clones derived from Jurkat leukemia T cell line: Focus on PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2013, 205(3): 198-211
- [10] 于力方, 廖杰, 王珊, 等. 激光扫描共聚焦显微术在人外周血淋巴细胞线粒体膜电位检测中的应用[J]. *感染, 炎症, 修复 ISTIC*, 2008, 9(3): 162-164

YU Li-fang, LIAO Jie, WANG Shan, et al. Application

- of laser scanning confocal microscopy to detect mitochondrial membrane potential of human peripheral blood lymphocytes [J]. *Infect Inflamm Rep, ISTIC*, 2008, 9(3): 162-164
- [11] Binet M T, Doyle C J, Williamson J E, et al. Use of JC-1 to assess mitochondrial membrane potential in sea urchin sperm [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2014, 452: 91-100
- [12] Fadnes B, Rekdal O, Uhlin-Hansen L. The anticancer activity of lytic peptides is inhibited by heparin sulfate on the surface of the tumor cells [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(1): 183
- [13] Fadnes B, Uhlin-Hansen L, Lindin I, et al. Small lytic peptides escape the inhibitory effect of heparan sulfate on the surface of cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(1): 116
- [14] Farnaud S, Evans R W. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties [J]. *Molecular Immunology*, 2003, 40(7): 395-405