

## 融合蛋白 TAT-RabGEF1 原核表达载体的构建及蛋白表达

方虹仪, 郭娜, 邢纪斌, 罗晨芳  
(中山大学附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】构建 PET28a-TAT-RabGEF1 重组质粒载体, 在 *E.coli* Rosetta (DE3) 菌株中高效表达并纯化融合蛋白, 研究 TAT-RabGEF1 融合蛋白对肥大细胞的跨膜转导活性。【方法】以小鼠组织 cDNA 为模板, 设计上游和下游含有限制性酶切位点和 TAT 序列的引物, PCR 扩增目的片段 TAT-RabGEF1, 并通过双酶切构建 PET28a-TAT-RabGEF1 重组质粒载体, 在 *E.coli* Rosetta (DE3) 大肠杆菌中诱导表达融合蛋白, 产物用亲和层析柱纯化后测量浓度及鉴定。CCK-8 检测融合蛋白的细胞毒性, 并用荧光显微镜及荧光分光光度计定性定量观察其对小鼠肥大细胞瘤细胞 P815 的转导活性。【结果】成功构建了 PET28a-TAT-RabGEF1 重组载体, 高效表达了具有较高特异性, 相对分子质量约为 57 ku 的融合蛋白 TAT-RabGEF1, 0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 TAT-RabGEF1 蛋白对细胞无明显毒性, 荧光显微镜显示 1  $\mu\text{mol/L}$  浓度的融合蛋白 TAT-RabGEF1 具有快速转导进入 P815 细胞内的能力, 且为进入细胞的饱和浓度。【结论】通过 TAT-RabGEF1 的原核表达和蛋白纯化分析, 证实了 TAT-PTD 的跨膜转导活性, 为研究 RabGEF1 在肥大细胞激活途径中的作用提供了物质基础。

**关键词:**鸟嘌呤核苷酸交换因子 1; TAT 蛋白; 融合蛋白; 载体构建

**中图分类号:**R3      **文献标志码:**A      **文章编号:**1672-3554(2018)01-0061-07

### Construction of Prokaryotic Expression Vector, Expression, Purification, and Identification of Fusion Protein, TAT-RabGEF1

FANG Hong-yi, GUO Na, XING Ji-bin, LUO Chen-fang

(Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: LUO Chen-fang, E-mail: luochenf@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To construct recombinant expression vector PET28a-TAT-RabGEF1, express, purify fusion protein effectively in *E.coli* Rosetta (DE3), and investigate its transmembrane effect in vitro on P815 cells. 【Methods】 With cDNA in rats' tissues as the template, two primers containing the TAT sequence and two designed enzyme restriction cutting sites were designed. TAT-RabGEF1 fragment was amplified by PCR, and its product was inserted into PET-28a vector to construct recombinant plasmid PET28a-TAT-RabGEF1 prokaryotic expression vector. The recombinant vector was transformed into *E.coli* Rosetta (DE3) and express fusion proteins. The protein products were purified by affinity chromatography. The efficiency of the transduction of fusion protein into P815 cells were detected by immunofluorescence and analyzed by fluorescence spectro-photometer, with using methods of CCK-8 to analyze the cells viability after transduction of different concentrations of fusion protein. 【Results】 The recombinant vector PET28a-TAT-RabGEF1 was constructed and the fusion protein TAT-RabGEF1 was successfully expressed in *E.coli* Rosetta (DE3). By western blotting and SDS-PAGE we can see that the protein products' relative molecular mass was about 57 ku, which was consistent with the target one, TAT-RabGEF1. The immunofluorescence results suggested that the fusion protein had the ability to transduce into P815 cells, and saturation of fusion proteins to be transduced into cells was 1  $\mu\text{mol/L}$ . 【Conclusion】 Constructed recombinant vector PET28a-TAT-RabGEF1 and expressed fusion protein, TAT-RabGEF1, which verified the TAT's ability of transduction. And it would build a solid technical foundation for the following research on the effect of RabGEF1's on the activation of mast cells.

**Key words:** RabGEF1; TAT protein; fusion protein; vector construction

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(1): 61-67]

收稿日期: 2017-09-20

基金项目: 广东省科技计划项目(2014A020212158)

作者简介: 方虹仪, 硕士研究生; 罗晨芳, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: luochenf@mail.sysu.edu.cn

鸟嘌呤核苷酸交换因子1(Rab5 GDP/GTP exchange factor1, RabGEF1)是近年发现的一个Rab5的鸟苷酸交换因子,属小G蛋白家族。它在肥大细胞中表达丰富,定位于细胞质,与肥大细胞的激活相关<sup>[1-2]</sup>,参与多种炎症性疾病,最新研究<sup>[3]</sup>发现,RabGEF1-/-基因缺陷的大鼠肥大细胞相关的炎症损伤加重,提示RabGEF1具有抑制肥大细胞功能的作用。若能通过特殊的方式把这一蛋白分子导入到机体肥大细胞中,将有利于防治肥大细胞介导的相关炎症性疾病。蛋白转导是近年来生命科学领域发现的一种具有高效跨膜转运功能和在细胞间自主传递特点的生命现象。大分子蛋白质、多肽及DNA通过蛋白转导结构域(protein transduction domains, PTD)以浓度依赖的方式高效快速导入细胞内,且不影响细胞的正常结构和功能<sup>[4]</sup>。人类免疫缺陷病毒HIV-1反式激活因子(transactivator, TAT)是目前研究较多的蛋白转导结构域,本试验将尝试通过连接TAT-PTD与RabGEF1蛋白,构建TAT-RabGEF1的原核表达系统,并获得纯化融合蛋白,观察其在小鼠肥大细胞瘤细胞P815的跨膜功能,为进一步探讨RabGEF1蛋白在抑制肥大细胞激活途径中的作用提供基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株与细胞 质粒PET-28a(Novagen)、菌株*E.coli* Rosetta (DE3)、DH5 $\alpha$ 感受态细胞由本实验室保存、小鼠肥大细胞瘤细胞P815(ATCC)。

1.1.2 主要试剂与仪器 T4 DNA Ligase酶、*Xho* I酶、*Hind* III酶(D2011A, TaKaRa), PVDF膜(MILLIPORE生产商), 扩增引物序列合成(苏州金唯智公司), KOD Plus Neo DNA Polymerase(东洋纺公司), DNA 凝胶回收试剂盒(DONGSHENG BIOTECH), 高纯质粒小量提取试剂盒(G-SHUN), RABGEF1质粒测序(上海生工基因公司), PCR扩增仪(GeneAmp), Ni-NTA beads(购于金斯瑞公司), BCA法蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物发展有限公司), 倒置荧光显微镜(Leica公司型号:DMI6000B), 荧光分光光度计(HITACHI, 型号:F-4500)。

### 1.2 研究方 法

1.2.1 引物设计与目的片段的合成 根据小鼠

TAT+RABGEF1 基因序列, 分别设计一对特异性引物, 引物 A: 5' cccaagcttTGAGGAAGAAGCG-GAGACAGCGACGAAGAAGCCTGAAGTCCGAAC-GCAGG3' (划线处为 *Hind* III F 酶切位点, 双划线处为 TAT 序列) 引物 B: 5' cgcctcgagCCCTGCGTAC-ACCTGAGGCTGCAGAG 3' (划线处为 *Xho* IR 酶切位点)。以小鼠组织 RNA 反转录产物为模板, 分别用引物 A、引物 B 进行 PCR 扩增。扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 98  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 68  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 扩增 30 个循环后, 68  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 16  $^{\circ}$ C 条件下保存上述 PCR 产物, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析鉴定。

1.2.2 重组质粒 PET28a-TAT-RABGEF1 的建立和阳性克隆鉴定 取 TAT-RABGEF1 PCR 回收产物和 PET-28a 载体各 15  $\mu$ L, 用 *Xho* I 与 *Hind* III 双酶切, 37  $^{\circ}$ C 反应 3 h。酶切产物经 1% 凝胶电泳后, 切取含有目的基因及载体的凝胶条带回收, 向反应体系中加入 T4 DNA Ligase 1  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 反应 1 h, 将目的片段与载体连接。连接产物转化至预先制备好的大肠埃希菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 菌悬液涂布于卡那(Kan, 100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。次日从平板上挑取若干单克隆于 3 mL LB 管中摇床过夜培养, 分别提取两种质粒加入 *Xho* I 与 *Hind* III 双酶 37  $^{\circ}$ C 酶切 2 h。酶切产物用含溴化乙锭(EB)的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。筛选含有目的片段的阳性质粒进行测序, 挑选阳性克隆并保存。

1.2.3 TAT-RABGEF1 原核表达和蛋白纯化、定性 将重组质粒 PET28a-TAT-RABGEF1 转化至 *E.coli* Rosetta (DE3) 中, 形成稳定的高表达菌株。挑取菌落划线培养于含卡那(Kan, 终浓度 100  $\mu$ g/mL)的 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养过夜(12~16 h)。进行预培养和扩大培养, 使其光密度  $D_{600nm}$  达到 0.4~0.8, 加入 2.5 mL 100 mmol/L 诱导剂 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷), 使其终浓度为 0.5 mmol/L, 18  $^{\circ}$ C 诱导培养过夜。次日收集细菌, 4 $^{\circ}$ C Tris 裂解液及超声裂菌(超声破碎 8 s, 间隔 10 s, 超声 30 次, 功率为 200 W), 离心 30 min(离心力 10 000  $\times$ g)收集上清加入 1 mL lysis buffer 预处理过的 Ni-NTA beads 亲和层析柱纯化, wash buffer 洗 2 遍, elution buffer (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L imidazole, adjusted to pH 7.4 with NaOH)洗脱下目的蛋白至 1.5 mL

EP管中,洗脱4~5次,BCA法定量测定蛋白浓度,产物进行SDS-PAGE电泳纯化鉴定和western blot定性分析。

**1.2.4 融合蛋白的毒性分析** CCK-8法检测细胞增殖来分析融合TAT-RABGEF1对P815细胞的毒性。将P815细胞置于含胎牛血清的RPMI-1640培养基,CO<sub>2</sub>培养箱(5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37℃)培养,设置实验分组为对照组(加入等容量PBS),TAT-RABGEF1蛋白(终浓度分别为0.1、1、10 μmol/L)。各分组细胞进行消化后吹打散细胞,计数,调整细胞浓度为1×10<sup>5</sup>个/mL,分到96孔板,每孔100 μL,即每孔细胞为1×10<sup>4</sup>个。收集各个时间点的细胞(12、24、48 h)加入CCK-8溶液,酶标仪D<sub>450nm</sub>读板,以此计算各实验组细胞生存率。

**1.2.5 融合蛋白的转导活性检测** 将P815细胞置于含胎牛血清的RPMI-1640培养基,CO<sub>2</sub>培养箱中复苏培养(5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37℃),分别加入纯化后无菌过滤的TAT-RABGEF1融合蛋白定量至0.1、1、10 μmol/L,并用FluoReporter FITC Protein Labeling Kit标记,作用于P815细胞3 h,PBS洗去培养液的细胞,40 g/L多聚甲醛溶液固定30 min,PBS洗3遍,DAPI(6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate)染色剂避光孵育5 min后荧光抗淬灭剂封片,镜检,拍照观察荧光在细胞内的分布。实验分组为:对照组, FITC组, 0.1 μmol/L TAT-RabGEF1-FITC组, 1 μmol/L TAT-RabGEF1-FITC组, 10 μmol/L TAT-RabGEF1-FITC组。每组样本随机选择细胞用荧光分光光度计(激发波长488 nm,发射波长525 nm)进行荧光定量分析。

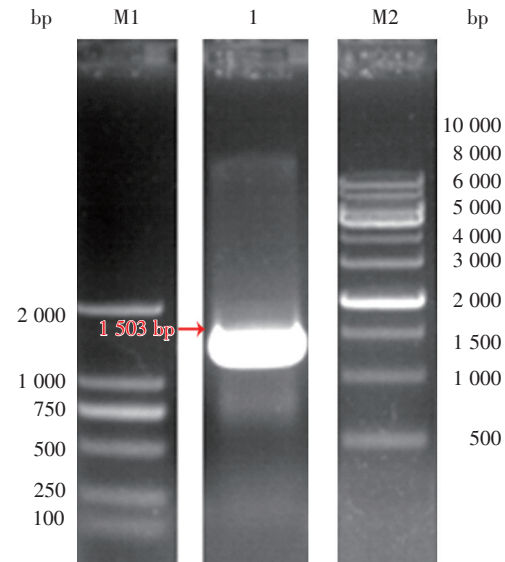
### 1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0软件包处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞毒性分析采用重复测量资料方差分析,细胞荧光定量分析采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TAT-RabGEF1基因的RT-PCR扩增

经RT-PCR扩增的TAT-RabGEF1产物经琼脂糖凝胶电泳后,可见大小约1 500 bp(1 503 bp)的单一清晰条带,与预计的TAT-RabGEF1基因片段相符(图1)。



M1: DL2000 DNA Marker ; 1: RT-PCR products of TAT-RabGEF1 gene; M2: 1 kb DNA Marker

图1 TAT-RabGEF1基因PCR电泳结果

Fig.1 Analysis of RT-PCR products of TAT-RabGEF1 gene by agarose gel electrophoresis

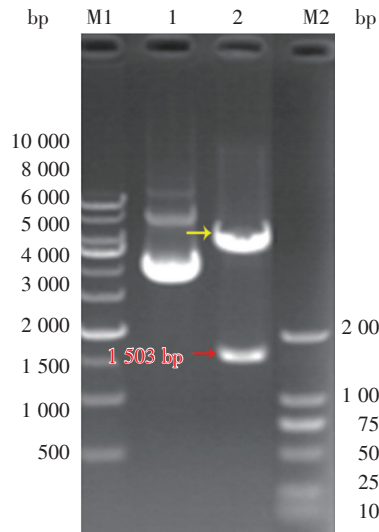
### 2.2 重组质粒PET28a-TAT-RabGEF1的酶切鉴定

PET28a-TAT-RabGEF1质粒经XhoI与HindIII双酶切鉴定结果如图2所示。结果表明TAT-RabGEF1(1 503 bp)在相应的位置切出一条目的条带,说明筛选到的克隆有阳性克隆,选取RabGEF1阳性质粒去测序。阳性重组质粒测序结果与Genbank中的全长的基因序列比对显示该质粒中含有小鼠TAT-RabGEF1基因的开放式阅读框架。测序结果进行Blast比对,结果表明TAT-RabGEF1已成功克隆至PET-28a载体中,与NCBI上已知序列进行BLAST 100%一致。

### 2.3 融合蛋白的表达与纯化

**2.3.1 TAT-RabGEF1蛋白的Western blot分析鉴定** 将构建好的PET28a-TAT-RabGEF1原核表达载体转化E.coli Rosetta (DE3)表达菌株,诱导蛋白表达。Native条件下纯化目的蛋白,western blot结果纯化后的融合蛋白与RabGEF1抗体结合。结果见图3。

**2.3.2 TAT-RabGEF1蛋白的SDS-PAGE分析鉴定** 重组载体转化E.coli Rosetta (DE3)菌在18℃经0.5 mmol/L IPTG诱导后,总菌体蛋白在57 ku处有明显增粗条带,与预期的重组表达融合蛋白大



M1: 1 kb DNA ladder marker; 1: recombinant vector, PET28a-TAT-RabGEF1; 2: Recombinant vector digested by *Hind* III F + *Xho*IR; M2: DL2000 marker

图2 重组质粒 *Hind* III F 酶和 *Xho*IR 酶双酶切产物电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant vector, PET28a-TAT-RabGEF1 digested by restriction enzymes *Hind* III F and *Xho*IR

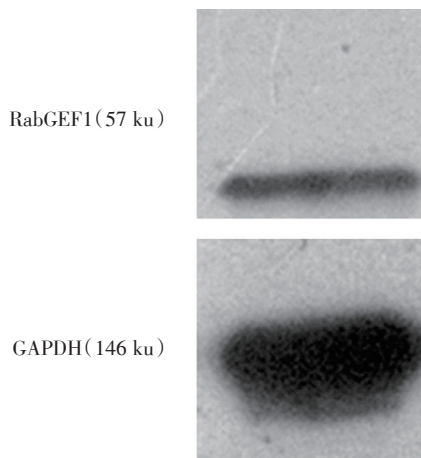


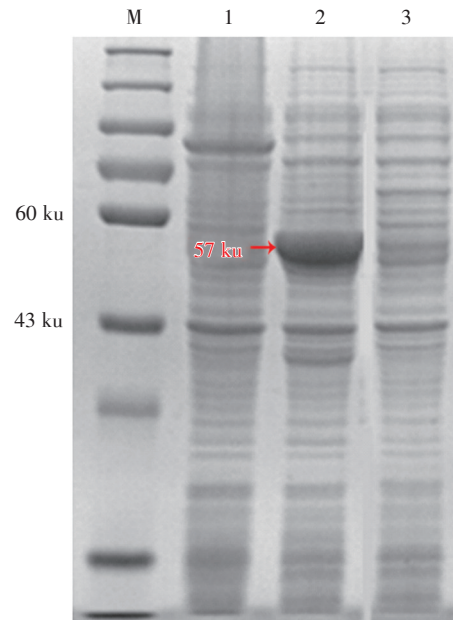
图3 融合蛋白 western blotting 结果

Fig.3 Identification of fusion protein products by western blotting

小一致,而未诱导菌在相应位置没有蛋白表达(图4)。同时对诱导表达的蛋白进行了溶解性分析,发现目的蛋白主要存在于上清中。

#### 2.4 融合蛋白 TAT-RabGEF1 细胞毒性检测

不同浓度的融合蛋白 TAT-RabGEF1 (0、0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 12、24、48 h, 对 P815 细胞生存



M: Protein marker; 1: products expressed by E.coli without induction of IPIG; 2: products expressed by E.coli with 0.5 mmol/L IPIG; 3: 0.5 mmol/L IPIG without PET28a expression vector.

图4 融合蛋白 TAT-RabGEF1 蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of fusion protein TAT-RabGEF1

率无影响 ( $F=1.55, P=0.24>0.05$ ), 说明融合蛋白 TAT-RabGEF1 对 P815 细胞无毒性作用(表1)。

表1 TAT-RabGEF1 对 P815 细胞生存率的影响

Table 1 Effect of TAT-RabGEF1 of different concentrations on the viability of P815 cells

( $\bar{x} \pm s, \%, n=5$ )

Action time	Control	TAT-RabGEF1		
		0.1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
12 h	100	98.3 $\pm$ 5.2	98.4 $\pm$ 6.8	97.3 $\pm$ 6.8
24 h	100	99.7 $\pm$ 6.8	95.8 $\pm$ 4.3	96.8 $\pm$ 5.6
48 h	100	95.6 $\pm$ 5.7	95.2 $\pm$ 5.0	96.6 $\pm$ 4.6

#### 2.5 融合蛋白 TAT-RabGEF1 进入 P815 细胞的转导活性检测

加入 FITC 标记 TAT-RabGEF1 蛋白达到 0.1  $\mu\text{mol/L}$  时, 已有少量蛋白进入细胞; 当加入量达到 1  $\mu\text{mol/L}$  时, 近 100% 的细胞中可以检测到 FITC 标记的 TAT-RabGEF1 融合蛋白; 而当再提高加入

的蛋白量(达到10  $\mu\text{mol/L}$ )时,进入细胞的阳性率和荧光强度均未有明显变化,说明当蛋白加入量达到1  $\mu\text{mol/L}$ 时,蛋白进入细胞已达到饱和。荧光定量分析结果见表2。图5所示为加入蛋白量为0及1  $\mu\text{mol/L}$ 时,3 h后蛋白进入细胞的情况。

表2 TAT-RabGEF1转导P815细胞荧光定量分析  
Table 2 Quantitative analysis of the transduction efficiency of TAT-RabGEF1 into P815 cells with fluorescence detection ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Control	FITC	TAT-RabGEF1		
		0.1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
4.6 $\pm$ 1.4	5.8 $\pm$ 2.4	57.1 $\pm$ 8.4 <sup>1)</sup>	142.2 $\pm$ 21.8 <sup>1)2)</sup>	145.0 $\pm$ 24.1 <sup>1)2)</sup>

1)  $P < 0.05$  vs Control; 2)  $P < 0.05$  vs TAT-RabGEF1 0.1  $\mu\text{mol/L}$

### 3 讨论

肥大细胞是机体获得性免疫的重要成员,其胞浆内含有大量颗粒物质,激活时释放组胺、5-羟色胺、类胰蛋白酶、白三烯及趋化因子等多种介

质。研究发现肥大细胞参与多种炎症性疾病的发生发展,抑制肥大细胞功能有助于减少机体炎症反应,减轻各种急慢性组织器官损伤,防止组织纤维化和结构重建<sup>[5]</sup>。目前抑制肥大细胞功能的药物或方法并不完善。如,苯并- $\gamma$ -吡喃酮和奈多罗米钠虽可抑制肥大细胞脱颗粒,但这种抑制程度取决于肥大细胞类型和药物剂量等因素;色甘酸钠虽被证实能抑制鼠肥大细胞分泌炎症介质,但其对人肥大细胞的作用有待深入研究<sup>[6]</sup>。最新研究<sup>[3]</sup>发现,RabGEF1可以有效阻断肥大细胞抗原-IgE交联的Fc $\epsilon$ RI<sup>[7]</sup>途径中RAS蛋白相关的信号通路<sup>[8-10]</sup>,促使RAS蛋白失活,且可调节SCF/c-kit R途径产生的生物学效应,从而抑制肥大细胞功能。而且RabGEF1蛋白结构简单,对人细胞无毒性,不影响基因组结构和表达,若能进入细胞发挥作用则能从“源头”阻断肥大细胞激活途径,抑制肥大细胞功能。

生物大分子跨膜转运的给药方法包括显微注射法<sup>[11-12]</sup>、病毒载体介导<sup>[13-14]</sup>、脂质体介导<sup>[15-16]</sup>、电穿孔法<sup>[17-18]</sup>等。这些方法因安全性不高,转运效率低,细胞结构破坏大等缺点,应用受到限制。蛋白转导作为新型的生物大分子给药方式,高效安

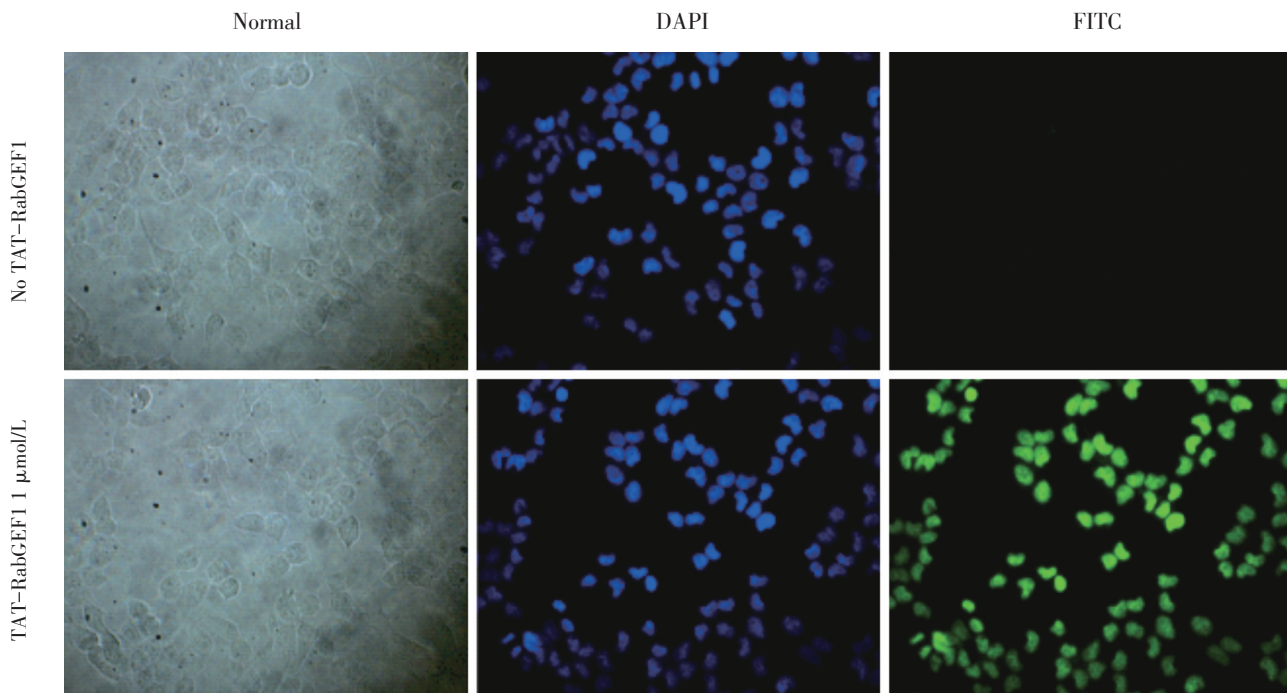


图5 TAT-RabGEF1蛋白转导P815细胞倒置荧光显微镜显示( $\times 200$ )

Fig.5 Results of transduction of TAT-RabGEF1 into P815 cells shown by flurescent inverted microscope ( $\times 200$ )

全。TAT是天然存在的转导蛋白结构域,可转导分子量超过100 ku的蛋白质<sup>[19]</sup>和DNA<sup>[20]</sup>分子跨越生物膜,包括血脑屏障。相比于VP22重组质粒转染,TAT融合蛋白具有以下优点<sup>[21]</sup>:不影响原细胞基因组结构;精准控制加入转化介质的蛋白浓度来控制胞内蛋白浓度;由于蛋白入胞时间快速,可控制作用时间和作用效果。因此,本研究构建PET28a-TAT-RabGEF1重组质粒载体,在*E.coli* Rosetta (DE3)菌株中高效表达并纯化融合蛋白,研究TAT-RabGEF1融合蛋白对肥大细胞的跨膜转导活性。

结果表明本实验利用原核表达系统成功建立了PET28a-TAT-RabGEF1重组载体并高效表达出融合蛋白TAT-RabGEF1,SDS-PAGE显示清晰条带,蛋白产物相对分子质量为57 ku,与预设的蛋白质量相符;Western blot显示原核表达产物与RabGEF1抗体相结合。在转导活性检测试验中,选用了小鼠肥大细胞瘤细胞P815,这是在肥大细胞体外脱颗粒模型和炎症性、过敏性疾病研究中应用最广泛的细胞系<sup>[22]</sup>,相比于RBL-2H3和Ku812细胞,P815细胞在相同刺激条件下,脱颗粒反应和炎症介质释放时间更早,且反应程度更显著,具有更高的灵敏度<sup>[23-24]</sup>,这一细胞系是用

于转导活性检测和后续对RabGEF1蛋白转导在肥大细胞激活途径中的机制研究的最优选择。利用小鼠P815细胞与不同浓度融合蛋白相互作用,发现在作用时间为3 h,1 μmol/L浓度的融合蛋白TAT-RabGEF1,37℃、5% CO<sub>2</sub>培养条件下,免疫荧光检测法发现融合蛋白完全进入细胞内,呈饱和状态;CCK-8细胞检测法显示细胞在不同浓度(0、0.1、1、10 μmol/L)融合蛋白TAT-RabGEF1作用下生存率无统计学差异,提示融合蛋白对小鼠P815细胞无细胞毒性。本实验中重组载体转入*E.coli* Rosetta (DE3)菌株时表达蛋白过程在18℃、0.5 mmol/L IPTG诱导条件下融合蛋白表达的产物纯度和浓度均可达到实验要求,原核表达蛋白纯化的条件已经达到相对优化的水平。本试验尚未研究TAT与蛋白之间的量效关系以及蛋白转导进入细胞时的培养条件对TAT转导活性的影响,今后可在这一问题上加以探讨。

本研究通过对TAT-RabGEF1原核表达载体的构建,蛋白产物的纯化和分析,证实了TAT分子的跨膜转运作用;所获取的高纯度TAT-RabGEF1融合蛋白为下一步研究RabGEF1在肥大细胞激活途径中的作用及相关炎症性疾病中的防治机制等提供了物质基础。

#### 参考文献

- [1] Kalesnikoff J, Rios EJ, Chen CC, et al. RabGEF1 regulates stem cell factor/c-kit-mediated signaling events and biological responses in mast cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(8): 2659-2664.
- [2] Kalesnikoff J, Rios EJ, Chen CC, et al. Roles of RabGEF1/Rabex-5 domains in regulating Fc epsilon RI surface expression and Fc epsilon RI-dependent responses in mast cells [J]. Blood, 2007, 109(12): 5308-5317.
- [3] Tam SY, Kalesnikoff J, Nakae S, et al. RabGEF1, a negative regulator of Ras signaling, mast cell activation and skin inflammation [C]. Novartis Found Symp, 2005: 271.
- [4] Bonetta L. Getting proteins into cells: The discovery and commercialization of protein transduction domains frees researchers from transfection troubles [J]. Scientist, 2002, 16(7): 38.
- [5] Virk H, Arthur G, Bradding P. Mast cells and their activation in lung disease [J]. Transl Res, 2016, 174(1): 60-76.
- [6] 肖淑华, 刘阳阳, 魏连海, 等. 肥大细胞的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2011, 42(2): 104-110. Xiao SH, Liu YY, Wei LH, et al. Advancement in researches of mast cell [J]. Progr Physiol Sci, 2011, 42(2): 104-110.
- [7] Sibilano R, Frossi B, Pucillo CE. Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways [J]. Eur J Immunol, 2014, 44(9): 2558-2566.
- [8] Hirasawa N, Scharenberg A, Yamamura H, et al. A requirement for Syk in the activation of the microtubule-associated protein kinase/phospholipase A2 pathway by Fc epsilon R1 is not shared by a G protein-coupled receptor [J]. J Biol Chem, 1995, 270(18): 10960-10967.

- [9] Hirasawa N, Santini F, Beaven MA. Activation of the mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 pathway in a rat mast cell line: Indications of different pathways for release of arachidonic acid and secretory granules [J]. *J Immunol*, 1995, 154(10): 5391-5402.
- [10] Jabril-Cuenod B, Zhang C, Scharenberg AM, et al. Syk-dependent phosphorylation of Shc: A potential link between FcepsilonRI and the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway through SOS and Grb2 [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(27): 16268-16272.
- [11] Mochizuki T, Kim J, Sasaki K. Microinjection of neuropeptide S into the rat ventral tegmental area induces hyperactivity and increases extracellular levels of dopamine metabolites in the nucleus accumbens shell [J]. *Peptides*, 2010, 31(5): 926-931.
- [12] Stein P. Microinjection of plasmids into meiotically incompetent mouse oocytes [Z]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009. doi:10.1101/pdb.prot5135
- [13] Lei L, Han D. Efficient transduction of spiral ganglion cells using adenovirus type 5 vector in the rat [J]. *Acta Otolaryngol*, 2010, 130(7): 810-814.
- [14] Xu Y, Gong B, Yang Y, et al. Adenovirus-mediated overexpression of glutathione-s-transferase mitigates transplant arteriosclerosis in rabbit carotid allografts [J]. *Transplantation*, 2010, 89(4): 409-416.
- [15] Tang J, Wei H, Liu H, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of itraconazole in rats and mice following intravenous administration in a novel liposome formulation [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17(4): 223-230.
- [16] Schwendener RA, Ludewig B, Cerny A, et al. Liposome-based vaccines [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 605: 163-175.
- [17] Stroh T, Erben U, Kuhl AA, et al. Combined pulse electroporation: A novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9488.
- [18] Charoo NA, Rahman Z, Repka MA, et al. Electroporation: An avenue for transdermal drug delivery [J]. *Curr Drug Deliv*, 2010, 7(2): 125-136.
- [19] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, et al. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse [J]. *Science*, 1999, 285(5433): 1569-1572.
- [20] Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, et al. Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 26204-26210.
- [21] 彭涛, 刘英辉, 杨春蕾, 等. 体内蛋白转导的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(5): 477-480.
- Peng T, Liu YH, Yang CL, et al. Research progress of protein transduction in vivo [J]. *J China Pharm Univ*, 2003, 34(5): 477-480.
- [22] Chan CL. Effects of Taiwan medicinal plants on asthmatic mediators releasing in mouse mastocytoma cell line P815 [D]. National Cheng Kung University, 2008.
- [23] 彭博, 贺蓉, 徐启华, 等. RBL-2H3和P815细胞用于建立体外肥大细胞脱颗粒模型比较研究 [J]. *中国天然药物*, 2011, 9(3): 227-231.
- Peng B, He R, Xu QH, et al. Comparison of RBL-2H3 and P815 cell lines for establishing in vitro model of mast cell degranulation [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(3): 227-231.
- [24] 高婕, 罗佳波, 雷林生, 等. 3种细胞用于建立体外肥大细胞脱颗粒模型比较研究及应用 [J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(3): 295-299; 304.
- Gao J, Luo JB, Lei LS, et al. Establishment of in vitro model of mast cell degranulation with three kinds of cell lines and its application [J]. *J Guangzhou Univ Chin Tradit Med*, 2012, 29(3): 295-299; 304.

(编辑 刘清海)