

可溶性 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的原核表达、鉴定与纯化及其对皮质神经元的跨膜转导

周国钰¹, 胡学强¹, 胡 骏², 陆正齐¹, 楼之茵¹, 朱灿胜¹, 熊洁萍²

(1. 中山大学附属第三医院神经病学科, 广东 广州 510630; 2. 中山医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】构建含蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)与脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)融合基因的表达质粒,原核表达可溶性 TAT PTD- Ngb, 并鉴定、纯化,检测 TAT PTD- Ngb 对皮质神经元的跨膜转导功能。【方法】提取 SD 大鼠脑组织总 RNA,通过 RT- PCR 法构建编码 TAT PTD- Ngb 的融合基因,克隆入 pET28b 原核表达载体,转化入大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS, 诱导表达,表达产物进行 SDS- PAGE、Western- blot 分析及可溶性鉴定,利用所表达的目的蛋白上的 6 个组蛋白用 Ni- NTA 琼脂进行亲和层析纯化,将不同浓度纯化的融合蛋白与原代培养皮质神经元共孵育 2 h,用 Western- blot 分析融合蛋白的跨膜转导。【结果】成功构建了含有 TAT PTD- Ngb 的原核表达载体,插入片段 500 bp,成功表达并纯化了可溶性 TAT PTD- Ngb 融合蛋白,相对分子质量约为 20 k, Western blot 鉴定显示表达蛋白具有抗原性,并具有转导入原代培养皮质神经元的功能,随给予蛋白浓度的增高进入神经元内的融合蛋白量增高。【结论】可溶性融合蛋白 TAT PTD- Ngb 可转导入皮质神经元,对进一步研究 Ngb 的功能及蛋白转导技术的应用奠定了基础。

关键词: 蛋白转导域; 脑红蛋白; 可溶性原核表达

中图分类号: Q816

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)02-0146-05

Prokaryotic Expression, Identification, and Purification of Soluble TAT PTD-Ngb Fusion Protein and Its Transmembrane Ability in Cortical Neurons

ZHOU Guo-yu¹, HU Xue-qiang¹, HU Jun², LU Zheng-qi¹, LOU Zhi-yin¹, ZHU Can-sheng¹, XIONG Jie-ping²

(1. Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Department of Pharmacology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To clone, express, purify the soluble Ngb fusion protein containing protein transduction domain of HIV- 1 trans- activator (TAT PTD- Ngb) and to verify its transmembrane ability in vitro. 【Methods】The sequence coding TAT PTD- Ngb fusion gene was amplified by PCR from rat brain RNA after being anti- transcribed to cDNA and cloned into the expression plasmid pET28b. After sequence analysis, the recombinants were transduced into the E.coli. BL21(DE3)pLysS, which was induced with IPTG (0.4 mmol/L) to express the TAT PTD- Ngb fusion proteins. Ni- NTA resin was used to purify the products, which were verified by means of SDS- PAGE and Western blot analysis subsequently. The primary cultured cortical neurons had been incubated in neurobasal medium with TAT PTD- Ngb at different final concentrations for 2 hours, and test the internalization of fusion protein into cells by Western blot analysis in order to examine the ability of TAT PTD- Ngb to transfer into cortical neurons. 【Results】The TAT PTD- Ngb expression vector were successfully constructed, containing the insert of 500 bp. The fusion protein TAT PTD- Ngb was about 20 k, which could react immunologically with anti- his- tag monoclonal antibody. Western blot analysis displayed that TAT PTD- Ngb internalized into neurons and the amount of fusion protein also increased with the final concentration of TAT PTD- Ngb in the culture medium. 【Conclusion】The recombinants TAT PTD- Ngb which expressed by E.coli BL21 could be transferred into cortical neurons. Our results

收稿日期: 2006-07-03

基金项目: 广东省教育厅 "211 工程" 专项基金资助项目(4209601)

作者简介: 周国钰(1975-), 女, 山东省潍坊市人, 主治医师, 博士研究生, 主要从事脑血管疾病的基础与临床研究; 胡学强, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E- mail: huxueqiangqm@yahoo.com.cn

will facilitate further functional study of Ngb and clinical application of protein transduction technology.

Key words: protein transduction; neuroglobin; prokaryotic soluble expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):146-151]

脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是新近发现的一种神经系统特异携氧球蛋白。目前的研究推测,广泛存在于脊椎动物中枢神经系统内的 Ngb 的功能可能是促进氧向神经元中的线粒体扩散,或直接介导氧向线粒体的传递^[1],有助于 ATP 的产生,从而对正常神经细胞功能的维持起重要作用, Ngb 可能能够保护神经元免受缺氧损伤,从而在神经系统缺氧、缺血损伤中具有重要的神经保护功能。对 Ngb 保护神经元的机制进行深入研究,将有可能对多种原因导致的缺氧性和退行性神经系统疾病带来全新的治疗方案。蛋白质转导域(protein transduction domain, PTD),是指能高效穿过生物膜的结构域,已经证明人类免疫缺陷病毒(HIV-1)的反式激活(trans-activator, TAT)蛋白的蛋白转导结构域能快速有效地将与之相连的肽段或蛋白质直接跨膜转运进入各种细胞及组织,转导效率很高而且对细胞没有损伤^[2,3]。蛋白转导被认为是一种很有前途的技术,在基础研究和临床治疗方面都有着非常广泛的应用前景。本研究引用 RT-PCR 法,将 HIV 的反式激活蛋白中 9 个氨基酸的 PTD 基因序列 RKKRRQRRR 融合入扩增的 Ngb 5 端,构建含有 TAT PTD- Ngb 融合基因的原核表达质粒,诱导表达、鉴定及纯化,用原代培养的原代皮质神经元对其跨膜转导功能进行检测,为下一步利用蛋白转导技术研究 Ngb 在神经系统内的功能奠定基础,提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 T7 RNA 聚合酶调控的表达质粒 pET28b 及表达 T7 RNA 聚合酶的大肠杆菌 BL21 (DE3)plysS 购自 Novagen 公司;pMD19-T simple 载体购自大连宝生物工程公司;大肠杆菌 DH5 由本校药理学教研室胡骏博士赠送。

1.1.2 试剂 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;合成 cDNA 第一链的逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司;Taq DNA 聚合、T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶购于大连宝生物工程公司;X-gal、IPTG 购于 AMRESCO 公司;质粒抽提试剂盒、胶回收纯

化试剂及 Ni-NTA 蛋白亲和纯化琼脂购于 QIAGEN 公司;抗 His-Tag 小鼠单克隆抗体购于 TIAGEN 公司,羊抗小鼠二抗购于武汉博士德生物技术有限公司;氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素均为 SIGMA 分装;ECL 试剂购自 PIERCE 公司;Neurobasal 培养基及 B27 购自 Gibco 公司。其余常规试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 PCR 引物 根据 Genbank 中大鼠 Ngb 和 TAT-PTD 基因序列设计了两条引物,即在 Ngb 成熟肽基因序列的 5 端融合了含有 PTD 基因序列,由上海生工生物技术有限公司合成。上游引物:5' CATATGAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTAGCATGGAGCGCCTAGAGTCAGAGCT 3' (含 Nde、Nhe 酶切位点);下游引物:5' GAGCTCTA CTCCCGTCCCAGCCTCG 3' (含 Sac 酶切位点)。扩增产物片段 500 bp。

1.1.4 实验动物 SD 乳鼠由中山大学实验动物中心提供。

1.2 TAT PTD- Ngb 基因的克隆

1.2.1 RT-PCR 扩增 TATPTD- Ngb 基因 取 SD 乳鼠脑组织用 Trizol 试剂提取脑组织总 RNA,按逆转录试剂盒说明合成 cDNA 第一条链,取 2 μL 逆转录产物进行 PCR,反应条件如下:94 预变性 5 min,94 30 s,68 40 s,72 1 min,循环 30 次,72 延伸 10 min。PCR 产物进行 0.15 g/L 琼脂糖电泳分析,并对目标条带切胶回收。

1.2.2 PCR 产物的克隆与测序 PCR 产物经胶回收纯化后与 pMD19-T simple 载体用 T4 DNA 连接酶 16 连接 2 h,转化 DH5 感受态,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,菌落经蓝白斑筛选,抽提质粒经 Nde / Nhe 限制性内切酶双酶切鉴定,选取含目标片段的单克隆菌落并送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.3 TAT PTD- Ngb 表达质粒的构建 用 Nde / Nhe 限制性内切酶从阳性 TA 克隆载体上切下 TAT PTD- Ngb 基因序列并胶回收,与同样酶切的含 His-tag 的 pET28b 表达载体 16 连接反应 2 h,构建表达质粒 pET-TAT PTD- Ngb,简称 pETPN,转化大肠杆菌 DH5 感受态,涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上,挑选菌落、质粒抽

提并经酶切鉴定筛选阳性单克隆, 送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的表达、纯化与鉴定

1.3.1 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的表达及可溶性分析 经酶切鉴定的 pETPN 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 感受态, 形成稳定的高表达菌株, 在含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素的 LB 平板上划单菌落, 挑取单菌落接种于 5 ml LB 培养液中 (含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氯霉素 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振摇过夜; 次日按 1 : 100 的比例接种至 10 mL 上述 LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振摇, 培养约 2~3 h, A 值至 0.6 左右, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 诱导表达 0, 1, 2, 4, 6, 8 h, 离心收集细菌沉淀, 按 10 : 1 的比例的加入 20 mmol/L Tris-Cl 溶液, 超声破碎细菌, SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况。取诱导表达 8 h 的细菌沉淀超声破碎产物 4 \times 15 000 $\times\text{g}$ 离心 30 min, 分别收集上清和沉淀, 加入 SDS-PAGE 电泳上样缓冲液, 检测上清和沉淀中 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的表达。

1.3.2 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的 Western blot 分析

取诱导表达 8 h 上清经 SDS-PAGE 电泳, 电泳完毕把蛋白转印硝酸纤维膜上, 0.5 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 抗融合蛋白 6 \times His-tag 单克隆抗体 4 过夜孵育, HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 试剂曝光显影定影分析。

1.3.3 可溶性 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的纯化、脱盐与储存 收集诱导表达 8 h 的细菌沉淀, 用含 10 mmol/L 咪唑的溶解缓冲液重悬菌体, 超声破碎后离心收集上清, 然后加入 Ni-NTA 树脂, 之后分别用含 20 mmol/L, 250 mmol/L 咪唑的缓冲液纯化表达的 TAT PTD- Ngb 融合蛋白。纯化蛋白经 PD-10 脱盐柱进行脱盐, 溶于含 100 mL/L 甘油的 Neurobasal 培养基中, -80°C 保存备用。

1.4 TAT PTD- Ngb 对皮质神经元的跨膜转导

1.4.1 原代皮质神经元的培养 取出生 24 h 以内的 SD 乳鼠, 无菌条件下分离皮质, 经浓度为 2.5 mg/L 胰酶消化 (37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min) 分散后, 加入 52 mg/mL 胰酶抑制剂终止消化, 细胞沉淀用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的解剖液洗涤后离心去上清, 加入含 2 mL/L B27 的 Neurobasal 培养基内, 以 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度种植在用多聚赖氨酸包被好的培养皿中 35 mm

培养皿 (2 mL/皿) 中, 置于含体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养, 每 3-4 d 半量换液 1 次。神经元培养至第 7 天用于实验。

1.4.2 TAT PTD 介导的 Ngb 蛋白的跨膜转导及其检测 培养的神经元用 Neurobasal 培养基全量换液, 培养基内加入不同终浓度 TAT PTD- Ngb 蛋白 (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内孵育 2 h, 吸去培养基, PBS 洗涤, 收集、裂解细胞, 细胞裂解液进行 Western-blotting 分析, 用抗融合蛋白上的 6 \times His-tag 单克隆抗体检测进入细胞内的融合蛋白, 并以纯化的 TAT PTD- Ngb 融合蛋白做为阳性对照。

2 结 果

2.1 TAT PTD- Ngb 融合基因的 RT-PCR 扩增

从 SD 大鼠脑组织中提取脑组织总 RNA, 逆转录后 PCR 扩增, 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 得到与预期大小一致的 DNA 片段 (500 bp), 经 TA 克隆并测序完全正确 (图 1)。

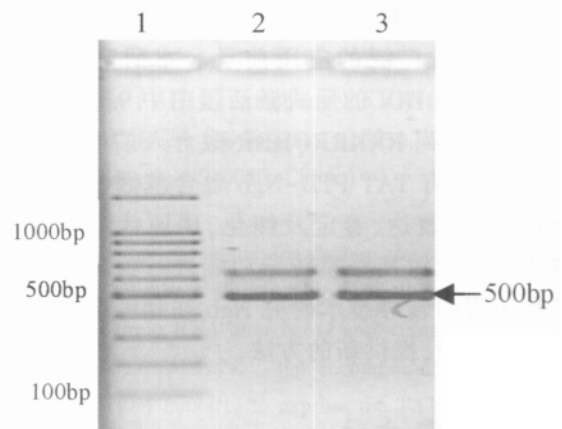


图 1 RT-PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果

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

1: 100 bp DNA marker ; 2, 3: RT-PCR products

2.2 重组 pETPN 质粒的酶切鉴定

重组 pETPN 质粒经 Nde I / Nhe I 双酶切后电泳, 显示切出与目的基因大小一致的 DNA 片段 (图 2)。插入片段经测序证明插入位置正确, 无突变, 表明克隆载体含有 TAT PTD- Ngb 基因序列, 测序结果见图 3。

2.3 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的原核表达

与对照菌相比, pETPN BL21 (DE3)plysS 重组

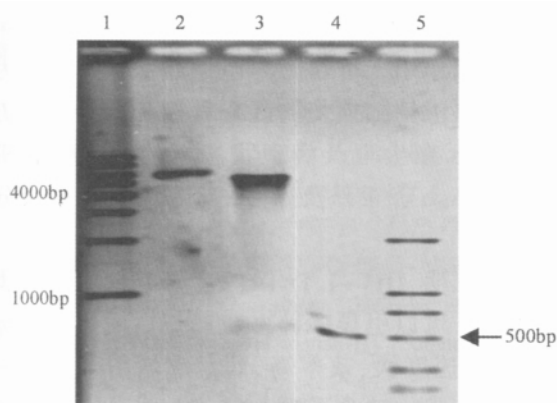


图 2 重组 pETPN 质粒的酶切鉴定结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pETPN digested by restriction enzymes

1: 1 kb DNA ladder marker; 2: Plasmid pETPN; 3: Recombinant plasmid pETPN digested by *Nde* I + *Sac* I; 4: PCR amplified TAT PTD-Ngb; 5: DL2000 marker

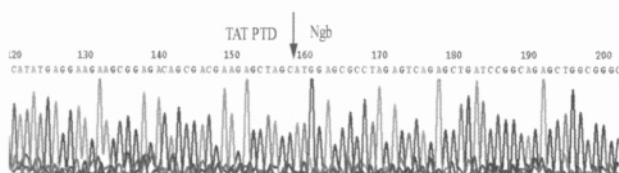


图 3 TAT PTD-Ngb 融合基因序列

Fig. 3 DNA sequence of the fusion region in TAT PTD-Ngb gene

菌 IPTG 诱导后, SDS- PAGE 电泳分析有目标分子量新的蛋白产生, 表观分子量 20 ku 左右, 随诱导时间延长目的蛋白表达量增高(图 4a, 箭头所示为目的蛋白条带), 可溶性分析显示, 上清中有目的蛋白, 蛋白为可溶性(图 4b)。

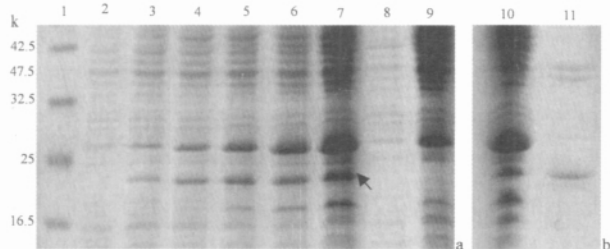


图 4 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的表达的 SDS- PAGE 分析

Fig. 4 SDS- PAGE analysis of expressed fusion protein
1: Protein marker ; 2-7: E. coli BL 21 (DE3) containing pETPN induced for 0, 1, 2, 4, 6, 8 h; 8-9: E. coli BL 21 (DE3) containing pET28b induced for 0, 8 h; 10: Supernatant of induced E. coli BL 21 (DE3)plysS containing pETPN; 11: Pellet of induced E. coli BL 21 (DE3) plysS containing pETPN

2.4 TAT PTD- Ngb 融合蛋白 Western blot 鉴定

为进一步对融合蛋白进行验证, 将细菌诱导表达前与诱导表达 8 h 的产物上清用抗融合蛋白的 6×His- tag 单克隆抗体进行 Western- blotting 分析, 结果显示融合蛋白在约 20 ku 显示单一条带, 与预计的目的蛋白分子量相符(图 5), 表明表达的目的蛋白具有抗原活性, 而含 pET28b 质粒的对照菌在诱导表达前与诱导表达 8 h 均无此条带。

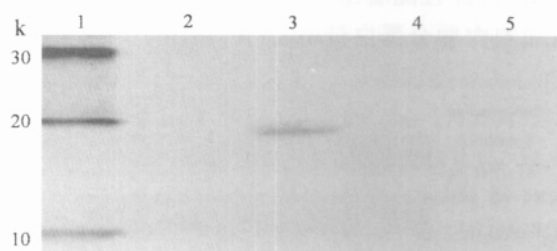


图 5 TAT PTD- Ngb 融合蛋白 Western blot 鉴定

Fig.5 Identification of expressed fusion protein by Western blot analysis

1: Protein marker ; 2: Supernatant of pre- induced E. coli BL 21 (DE3)plysS containing pETPN; 3: Supernatant of induced E. coli BL 21 (DE3)plysS containing pETPN for 8 h; 4: Supernatant of pre- induced E. coli BL 21 (DE3)plysS containing pET28b; 5: Supernatant of induced E. coli BL 21 (DE3)plysS containing pET28b for 8 h

2.5 可溶性 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的纯化

取诱导表达 8 h 含大量 TAT PTD- Ngb 融合蛋白的表达产物, 利用 TAT PTD- Ngb 融合蛋白上的 6×His 标签, 用 Ni- NTA 进行亲和纯化, 纯化产物分析结果见图 6。凝胶经灰度扫描分析显示, 纯度在 95% 以上。

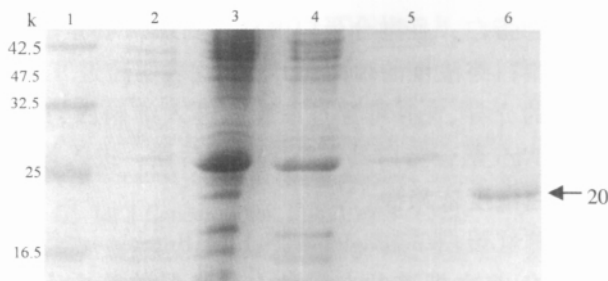


图 6 可溶性 TAT PTD- Ngb 融合蛋白纯化产物的 SDS- PAGE 分析

Fig. 6 SDS- PAGE analysis of purified soluble TAT PTD- Ngb fusion protein

1: Protein marker; 2: Supernatant of noninduced strain transformed with pETPN; 3: Supernatant of induced strain containing pETPN ; 4: Lysate in 10 mmd/L imidazole after affinity with Ni- NTA; 5: Washed by 20 mmd/L imidazole; 6: Eluted by 250 mmd/L imidazole

2.6 TAT PTD 介导的 Ngb 对原代培养皮质神经元的跨膜转导

将 TAT PTD-Ngb 融合蛋白分别以不同终浓度加入原代培养皮质神经元培养基内, 孵育 2 h 后, 提取细胞内蛋白, 以抗 6×His-tag 单克隆抗体检测细胞内融合蛋白含量, 结果显示, 细胞内检测到 TAT PTD-Ngb 融合蛋白, 与对照的融合蛋白条带相同, 并且随着给予融合蛋白浓度的增高, 检测到细胞内融合蛋白量增高(图 7)。

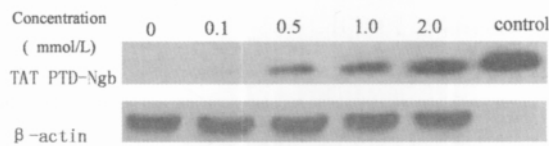


图 7 TAT PTD 介导的皮质神经元 Ngb 蛋白跨膜转导 Western-blot 分析

Fig.7 Western blot analysis of Ngb transduction in TAT PTD-Ngb treated primary cortical neurons 2 hours after incubated with protein at different final concentrations

3 讨论

本实验以 pET28b 为载体, 成功构建了融合蛋白 TAT PTD-Ngb 的原核表达质粒, 诱导其表达, 并利用 pET28b 上的 6×His-tag 纯化出高纯度的可溶性 TAT PTD-Ngb 融合蛋白。纯化后的蛋白经 Western-blot 检测, 与特异性抗体具有良好的特异性反应及抗原活性。我们将一定浓度的经纯化的 TAT PTD-Ngb 融合蛋白与原代培养的皮质神经元共同孵育后, Western-blot 分析可检测到细胞内存在融合蛋白, 且融合蛋白的含量随加入培养基内融合蛋白终浓度的增高而升高。这表明通过 TAT PTD 的介导, Ngb 可穿过细胞膜进入细胞内, TAT PTD-Ngb 融合蛋白具有跨膜转导活性, 进入量具有蛋白浓度依赖性。

脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)是 Burmester^[4]等于 2000 年首次报道的在一种人和小鼠的脑内存在的, 在神经系统中大量特异性表达的携氧球蛋白, Ngb 在对氧大量需求的神经系统中广泛表达。大量研究显示, 缺氧能够诱导 Ngb 表达, 与其他的携氧球蛋白相似, Ngb 能够可逆性地与氧结合, 并与氧有极高的亲和力, 在急性缺血缺氧的情况下可迅速地释氧, 从而提高神经细胞的存活率和功能的发挥, 降低其表达则会增加组织和细胞的缺氧

损伤程度^[5]。研究推测, Ngb 可能作为一个神经保护因子而起作用, 可作为内源神经保护因子成为治疗缺血缺氧性脑损伤的研究目标。但是目前仍不明确 Ngb 在生理及病理状态下的神经保护机制。因此, Ngb 能否以及如何用于脑血管疾病十分值得探讨。

研究证明, HIV-1 TAT-PTD 具有独特的跨膜运转方式, 可以引导多种多肽和蛋白质进入目标细胞, 转导速度快、效率高, 而且它所引导的蛋白质可以具有很大的分子量, 能将相对分子质量超过 1 000 k 的蛋白质转运到大部分哺乳动物细胞内, 而且大的粒子转运入细胞不影响细胞活力和蛋白活性与功能^[6]。重要的是, TAT PTD 介导的蛋白质甚至可以直接通过血脑屏障直接进入脑组织和神经元, 因此该技术将对于治疗神经系统疾病有重要意义, 已有学者将如 BCL-XL、GDNF、FNK、XIAP 等具有脑保护作用的因子利用 PTD 的转导功能将其引入脑缺血模型, 取得了良好的保护效果^[7-10], 并且与将蛋白引入细胞的传统方法如蛋白微注射、穿孔蛋白及脂质体法等相比, TAT PTD 介导的蛋白转导有着显著的优越性。蛋白转导不依赖于受体和转运蛋白, 也不需要能量, 具有浓度和时间依赖性, 这一过程可能和蛋白转导域中存在碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)有关, 这些带有强正电荷的氨基酸, 通过直接与带负电荷的细胞膜脂类相互作用而介导穿膜过程^[11], 最近的研究认为细胞膜脂质筏介导的巨胞饮参与了蛋白转导机制^[12]。目前的研究发现, TAT 序列中具有转导作用的最小序列是富含碱性氨基酸, 具有较多正电荷的多肽片段: 从 49 至 57 这 9 个氨基酸残基 RKKRRQRRR, 它与以前许多研究者曾经使用的 11 个氨基酸的序列 PTD 序列具有相似的蛋白转导效率^[11], 我们的研究中, TAT PTD 即采用了这一最小的 9 个氨基酸序列, 进一步减小了蛋白转导域对其所引导蛋白的影响及 HIV TAT-PTD 可能具有的目前尚不清楚的副作用。

本实验可溶性 TAT PTD-Ngb 融合蛋白的表达、纯化及其跨膜转导入皮质神经元, 为进一步应用蛋白转导技术进行 Ngb 的神经保护机制研究奠定了基础, 为 Ngb 应用于脑血管疾病及其他神经系统疾病创造了可能, 为蛋白转导技术作为一种新颖的分子治疗措施应用于临床提供了依据。

参考文献:

- [1] COUTURE M, BURMESTERT, HANKELNT, et al. The heme environment to mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36377- 36382.
- [2] SCHWARZE S R, HO A, VOCERO- AKBAM A, et al. In vivo protein transduction: Delivery of biologically active protein into the mouse [J]. *Science*, 1999, 285 (5433): 1569- 1572.
- [3] SCHWARZE S R, DOWDY S F. In vivo protein transduction: Intracellular delivery of biologically active protein, compounds and DNA [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21(2): 45- 48.
- [4] BURMESTER T, WEICH B, REINHARDT S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain [J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 520- 523.
- [5] SUN Y, JIN K, MAO X O, et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic - ischemic injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (26): 15306- 15311.
- [6] DODD C H, HSU H C, CHU W J, et al. Normal T-cell response and in vivo Magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles[J]. *J Immunol Methods*, 2001, 256 (1- 2): 89- 105.
- [7] ZHANG W R, HAYASHI T, IWAI M, et al. Time dependent amelioration against ischemic brain damage by glial cell line derived neurotrophic factor after transient middle cerebral artery occlusion in rat [J]. *Brain Res*, 2001, 903 (1- 2): 253- 256.
- [8] CAO G, PEI W, GE H, et al. In vivo delivery of a Bcl - xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis[J]. *J Neurosci*, 2002, 22 (13): 5423- 5431.
- [9] ASOH S, OHSAWA I, MORI T, et al. Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (26): 17107- 17112.
- [10] GUEGAN C, BRAUDEAU J, COURIAUD C, et al. PTD- XIAP protects against cerebral ischemia by anti- apoptotic and transcriptional regulatory mechanisms [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22 (1): 177- 186.
- [11] JINSEU P, JIYOON R, KYEONGAK, et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(5): 1173- 1181.
- [12] WADIA J S, STAN R V, DOWDY S F. Transducible TAT- HA fusogenic peptide enhances escape of TAT- fusion proteins after lipid raft macropinocytosis [J]. *Nat Med*, 2004, 10(3): 310- 315.
- (编辑 刘清海)
-
- (上接第 145 页 from page 145)
- [6] MACKEIGAN J P, CLEMENTS C M, LICH J D, et al. Proteomic profiling drug - induced apoptosis in non - small cell lung carcinoma: identification of RS/DJ- 1 and RhoGDIalpha [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (20): 6928- 6934.
- [7] Hod Y. Differential control of apoptosis by DJ- 1 in prostate benign and cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(6): 1221- 1233.
- [8] GRZMIL M, VOIGT S, THELEN P, et al. Up- regulated expression of the MAT- 8 gene in prostate cancer and its siRNA- mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(1):97- 105.
- [9] YOKOTA T, SUGAWARA K, ITO K, et al. Down regulation of DJ- 1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312 (4):1342- 1348.
- [10] PARDO M, GARCIA A, THOMAS B, et al. The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG - 1 metastasis markers and leads to the identification of DJ- 1 as a potential serum biomarker [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(5):1014- 1022.
- [11] 雷文斌, 苏振忠. eIF4E 在喉癌和下咽癌组织中的表达及意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25 (3): 108- 111.
- [12] ZHU C Q, BLACKHALL F H, PINTILIE M, et al. Skp2 gene copy number aberrations are common in non- small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 1984- 1991.
- (编辑 刘清海)