

# TAT-Cytoglobin 融合蛋白的原核表达、纯化及生物活性分析

张如婧<sup>1</sup>, 李招发<sup>1,2</sup>, 施伟杰<sup>1</sup>, 许瑞安<sup>1,2</sup>

1 华侨大学生物医学学院, 福建 泉州 362021

2 分子药物教育部工程研究中心, 福建 泉州 362021

张如婧, 李招发, 施伟杰, 等. TAT-Cytoglobin 融合蛋白的原核表达、纯化及生物活性分析. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1247-1255.

Zhang RJ, Li ZF, Shi WJ, et al. Expression, purification, and characterization of fusion protein TAT-Cytoglobin. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1247-1255.

**摘要:** 旨在利用细胞穿膜肽 TAT 的穿膜作用和细胞珠蛋白 (Cytoglobin, Cygb) 的抗衰老、抗纤维化的功能, 将二者通过基因工程的手段融合在一起, 以期获得能够穿透细胞屏障的 Cygb。通过两次重叠 PCR 技术获得了 TAT-Cygb DNA, 将其插入原核表达载体 pET22b 质粒中, 转化至大肠杆菌 BL-21, 筛选出可表达 TAT-Cygb 融合蛋白的大肠杆菌工程菌株。经乳糖诱导表达 TAT-Cygb, CM 阳离子交换层析 (CM Sepharose Fast Flow Protocol) 获得纯度高达 95% 的 TAT-Cygb 融合蛋白, 分子量约 23 kDa。生物活性实验显示, TAT-Cygb 过氧化物酶比活力达到  $(422.30 \pm 0.36)$  U/mg。TAT-Cygb 预处理的 HacaT 细胞可免受  $H_2O_2$  氧化应激的损伤 (RGR=100%), 同时 TAT-Cygb 可治疗已被  $H_2O_2$  氧化损伤的细胞 (RGR=98%), 与 Cygb 处理组相比具有显著差异 (RGR=79%)。该研究首次成功利用大肠杆菌表达系统表达了可穿透细胞膜的、有生物活性的 TAT-Cygb 融合蛋白, 为继续开展 Cygb 在抗衰老、抗纤维化和抗癌领域的研究奠定了基础。

**关键词:** 细胞穿膜肽, 细胞珠蛋白, 融合蛋白, 纯化, 氧化应激

**Received:** November 11, 2013; **Accepted:** December 13, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81072578, 81271692).

**Corresponding author:** Zhaofa Li. Tel/Fax: +86-595-22690838; E-mail: lizhaofa@hqu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81072578, 81271692) 资助。

网络出版时间: 2014-02-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130573.html>

# Expression, purification, and characterization of fusion protein TAT-Cyoglobin

Rujing Zhang<sup>1</sup>, Zhaofa Li<sup>1,2</sup>, Weijie Shi<sup>1</sup>, and Rui'an Xu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, Fujian, China

<sup>2</sup> Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Quanzhou 362021, Fujian, China

**Abstract:** The aim of this study was to obtain a cell-penetrating cytoglobin (Cygb), which combines the transmembrane function of cell-penetrating peptides TAT with the anti-aging and anti-fibrotic role of cytoglobin. The Cygb gene was complexed with TAT gene by overlapping PCR, inserted into the vector pET22b to construct the recombinant expression plasmid (pET22b-TAT-Cygb) and then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The fusion protein TAT-Cygb, whose expression was induced by lactose, was purified by CM Sepharose Fast Flow Protocol and verified by Western blotting. The final TAT-Cygb had a molecular weight of 23 kDa with 95% purity, as shown by SDS-PAGE. As demonstrated by bioactivity experiments, TAT-Cygb exhibited a high specific peroxidase activity up to (422.30±0.36) U/mg. Both TAT-Cygb and Cygb pretreatment group could protect Hacat cells against oxidation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but only TAT-Cygb treatment group could remedy cells injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RGR=98%), which was significantly different from Cygb treatment group (RGR=79%). We successfully obtained the bioactive and cell-penetrating fusion protein TAT-Cygb that has the potential application in anti-aging, anti-fibrotic and anti-cancer.

**Keywords:** cell-penetrating peptides, cytoglobin, fusion protein, purification, oxidative stress

细胞珠蛋白 (Cytoglobin, Cygb) 是由 190 个氨基酸组成、分子量为 21.4 kDa 的一种细胞内球蛋白,在高等脊椎动物各组织中广泛分布<sup>[1]</sup>,最初由 Kawada 等在大鼠肝星状细胞 (Hepatic stellate cells, HSC) 中发现<sup>[2]</sup>。研究表明 Cygb 具有过氧化物酶活性,可清除氧自由基,因此可保护组织免受氧化应激的损伤<sup>[3-6]</sup>。本课题组曾通过 siRNA 干扰内源性 Cygb 基因,在人肝星状细胞系 LX-2 内过表达 Cygb,证明内源性 Cygb 对过氧化氢及铁过载两种氧化应激模型导致的肝星状细胞损伤都具有显著性的保护作用,而体外 Cygb 对细胞内的活性氧清除效果不理想,推测与 Cygb 进出细胞缺乏相应的主动运输机制有关<sup>[7]</sup>。因此体外表达的 Cygb 成功进入细胞便成为发挥 Cygb 作用的前提和关键。

细胞穿膜肽,即 CPPs,又称为蛋白转导域

或膜转导肽,是一种由 30 个或者更少氨基酸组成的能够穿透细胞膜的多肽,能够运载生物活性物质如肽、蛋白、反义核苷酸和脂质体等许多物质<sup>[8-10]</sup>。TAT 是最短的 CPPs 之一,含有 11 个氨基酸,已证明通过 TAT 的 N 端连接的融合蛋白能够在体外转导几乎所有检测过的细胞类型<sup>[11-13]</sup>。本实验通过将 TAT 与人源 Cygb 融合表达,使 Cygb 在 TAT 介导下转入细胞,并表现出很好的过氧化物酶等生物活性,有望应用于护肤品行业,同时促进了 Cygb 在抗衰老、抗纤维化和抗癌方面的研究<sup>[14-15]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人 Cygb 质粒、pET22b(+)、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* BL21 (DE3) 均

为本实验室保存。Pfu、T4 DNA 连接酶、DNA 纯化凝胶回收试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。*Nde* I、*Eco*R I 购自大连宝生物工程有限公司。1 kb DNA Ladder 购自北京索莱宝科技有限公司。DNA Marker V 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。基因工程引物 TAT-1、TAT-2 和 TAT-3 由上海赛百盛基因技术有限公司合成。鼠抗 Cygb 一抗和羊抗鼠 HRP-IgG 抗体购自 Santa Cruz。CM-Sepharose 购自 GE 医疗生物科学公司。人正常肝细胞株 Chang Liver 购自复旦大学。人永生化角质细胞 Hacat 购买自中国科学院昆明细胞库。

## 1.2 方法

### 1.2.1 原核表达载体 pET22b-TAT-Cygb 的构建

通过两次 PCR, 利用特异引物基因序列 (表 1) 将编码穿膜肽 TAT (YGRKKRRQRRR) 以及 TAT 和 Cygb 之间的 Linker (GGGGSGGGGS) 的核苷酸序列添加到 Cygb 基因的 5'端, 并在引物 TAT-2 和 TAT-3 中分别加入 *Nde* I 和 *Eco*R I 限制性酶切位点。第一次 PCR 以人 Cygb 质粒为模板, 用上游引物 TAT-1 和下游引物 TAT-3 进行扩增; 第二次 PCR 以经凝胶回收的第一次 PCR 产物作为模板, 用上游引物 TAT-2 和下游引物 TAT-3 扩增, 得到 TAT-Cygb 成熟蛋白对应的 DNA。目的片段回收、酶切后插入至 pET22b(+) 载体的 *Nde* I/*Eco*R I 位点之间。转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  后经菌落 PCR、酶切等方法筛选出符合要求的阳

性克隆, 委托南京金斯瑞公司对 pET22b(+) 中插入的 TAT-Cygb 基因序列进行测序。

### 1.2.2 TAT-Cygb 融合蛋白的诱导表达与纯化

将 pET22b-TAT-Cygb 表达载体转入感受态的 *E. coli* BL21 宿主菌, 菌落 PCR 鉴定。取阳性克隆接种于乳糖诱导培养基中培养 20 h, 10 000 r/min 离心收集菌体沉淀, 并置于 -80 °C 和 4 °C 反复冻融两次裂解细菌, 用 Tris-HCl 上样缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 重悬全菌蛋白。15 000 r/min、4 °C 离心 15 min 收集上清。由于 TAT 中含有多个带正电的氨基酸, 使融合蛋白 TAT-Cygb 等电点升高, 因此可通过阳离子交换层析 (CM Sepharose Fast Flow Protocol) 纯化蛋白。样品过柱后, 用清洗缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0) 洗去杂蛋白, 再用洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0) 洗脱, 收集唯一的洗脱峰即为融合蛋白。经 Sephadex G-25 凝胶过滤层析脱盐后, SDS-PAGE 电泳检测纯度。

### 1.2.3 免疫印迹鉴定

纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE 分离后电转至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 滴加鼠抗 Cygb 一抗 (1 : 300), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 再滴加 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (1 : 1 000), 37 °C 孵育 2 h, TBST 和 PBS 各洗膜 3 次, 最后使用 BeyoECL 荧光检测试剂检测目的蛋白, X 胶片曝光后显影、定影。

表 1 构建融合蛋白 TAT-Cygb 原核表达载体所用引物序列

Table 1 Primer sequences for the construction of TAT-Cygb expression vectors

Primer name	Primer sequence (5'-3')
TAT-1	CGTCGTGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCATGGAGAAAGTGCCAGGCGAG
TAT-2	AGACATAATGTCACGGTCGTAAAAACGTCGTCAGCGTCGTCGGTGGTGGTGGTAG
TAT-3	AGAGAATTCCTACGGCCCCGAAGAGGG

Restriction sites were underlined, the nucleotide sequence of linker and TAT in TAT-1 and TAT-2 were covered with shading respectively.

### 1.2.4 细胞免疫化学验证 TAT-Cygb 的穿膜能力

取对数生长期的 Chang liver 细胞消化后,按 30 000 细胞/孔接种于 24 孔板中,2 mL/孔。培养 48 h 后,加药作用细胞,空白对照加无血清培养基,阴性对照加 10  $\mu\text{mol/L}$  Cygb 的无血清培养基,实验组加含 10  $\mu\text{mol/L}$  TAT-Cygb 的无血清培养基。加药作用 1.5 h 后,PBS 洗 3 次;固定液室温作用 15 min 后,PBS 洗 3 次;通透液室温孵育 20 min 后,PBS 洗 3 次;内源性过氧化物酶阻断剂室温作用 15 min 后,PBS 洗 3 次;封闭液 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后,PBS 洗 3 次;加入抗 Cygb 鼠抗 (1 : 200) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜后,PBS 洗 3 次;加入 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (1 : 1 000) 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后,PBS 洗 3 次。DAB 方法进行显色,具体方法见迈新 DAB 显色试剂盒。显色完全后用中性树脂封藏。

### 1.2.5 表达产物活性分析

1) TAT-Cygb 蛋白过氧化物酶活性的测定:利用愈创木酚法测定重组 TAT-Cygb 蛋白的过氧化物酶活性。将波长 470 nm 处反应体系每分钟吸光值 A 变化 0.01 定义为一个过氧化物酶活力单位。每毫克蛋白所含的酶活力单位数为比活力。实验重复 3 次,得出纯化后的重组 TAT-Cygb 蛋白过氧化物酶活性。

2) TAT-Cygb 对人永生角质细胞 Hacat 增殖的影响:取对数生长期的 Hacat 细胞消化后,按 10 000 细胞/孔接种于 96 孔板中,100  $\mu\text{L}$ /孔。贴壁后加入 TAT-Cygb 蛋白 (终浓度依次为 10、20、30、40、50、60 mg/L),对照组加等体积 PBS,于 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 48 h,PBS 洗 3 次,加入 10  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT (工作浓度 0.5 mg/mL),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。弃掉 MTT,加 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,微量振荡器上振荡 10 min。以 DMSO 调零,在酶联免疫检测

仪于 492 nm 波长测定 OD 值,参照波长 630 nm。

3) TAT-Cygb 蛋白抗氧化作用:利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 Hacat 细胞的氧化模型来研究 TAT-Cygb 蛋白抗氧化作用。取对数生长期的 Hacat 细胞消化后,按 10 000 细胞/孔接种于 96 孔板中,100  $\mu\text{L}$ /孔。贴壁后加入终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  于 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 48 h,进行 MTT 检验。TAT-Cygb (60 mg/L, 20 mg/L) 或 Cygb (60 mg/L, 20 mg/L) 分别于  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理前 30 min 或  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后 30 min 加入培养液中。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体 pET22b-TAT-Cygb 的构建与鉴定

通过两次 PCR 法从人 Cygb 质粒中扩增 Cygb 基因序列,并连接上穿膜肽 TAT 序列得到 TAT-Cygb 序列,回收 DNA 片段长度约 654 bp,与预计值相符。将 *Nde* I / *Eco*R I 酶切 PCR 产物插入 pET22b (+),成功构建 pET22b-TAT-Cygb 原核表达载体,并转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。菌落 PCR、质粒酶切图谱 (图 1A) 及测序结果显示 pET22b-TAT-Cygb 重组质粒构建成功。

### 2.2 TAT-Cygb 融合蛋白的表达纯化与鉴定

将 pET22b-TAT-Cygb 表达载体转入感受态的 *E. coli* BL21 宿主菌,涂布 LB 平板,经菌落 PCR 扩增出的 654 bp 片段的菌落为阳性克隆 (图 1B)。菌体裂解后的上清,经过阳离子交换 (CM Sepharose Fast Flow Protocol) 层析,并经 Sephadex G-25 凝胶过滤层析脱盐、过滤除菌后就得到 TAT-Cygb 蛋白原液。通过该纯化工艺,可以获得纯度大于 95% 的 TAT-Cygb 蛋白。纯化过程中 TAT-Cygb 蛋白产物的纯度分析见图 2A。

目的蛋白 TAT-Cygb 蛋白分子量约为 23 kDa, 由于 TAT 中碱性氨基酸比例较高, 使其在 SDS-PAGE 上的迁移率变小, 因此显示的分子量略有偏大。Western blotting 分析表明, TAT-Cygb

融合蛋白可与鼠抗 Cygb 发生特异性反应, 说明纯化的融合蛋白是有活性的 TAT-Cygb (图 2B)。用 BCA 蛋白检测试剂盒测定 TAT-Cygb 蛋白原液浓度为 2.105 g/L。

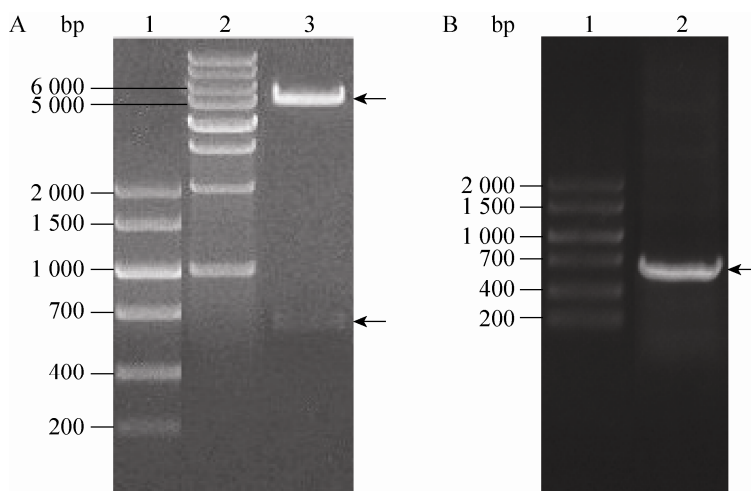


图 1 重组表达质粒 pET22b-TAT-Cygb 和 BL21 阳性转化子的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant expression vector pET22b-TAT-Cygb and BL21 positive transformants. (A) PCR and restriction analysis of pET22b-TAT-Cygb. 1: DNA marker V; 2: 1 kb DNA ladder; 3: pET22b-TAT-Cygb digested with *EcoR* I and *Nde* I. (B) PCR analysis of BL21 positive transformants. 1: DNA marker V; 2: BL21/pET22b-TAT-Cygb cDNA.

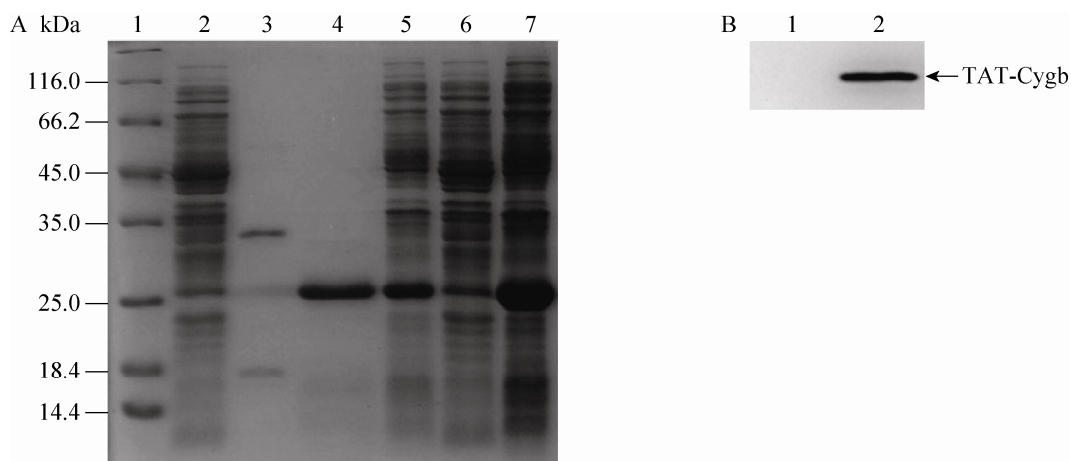


图 2 融合蛋白 TAT-Cygb 的纯化及 Western blotting 分析

Fig. 2 Analysis of the TAT-Cygb fusion proteins purified by CM Sepharose Fast Flow Protocol. (A) SDS-PAGE analysis. 1: protein marker; 2: flow-through; 3: the eluted fractions with 100 mmol/L NaCl; 4: the eluted fractions with 500 mmol/L NaCl; 5: lysate of *E. coli* BL21 transformed with pET22b-TAT-Cygb; 6, 7: supernatant and sediment of lysate from *E. coli* BL21 transformed with pET22b-TAT-Cygb. (B) Western blotting analysis. 1: sample from BL21/pET22b; 2: sample from BL21/pET22b-TAT-Cygb.

### 2.3 细胞免疫化学

将人正常肝细胞株 Chang Liver 分别用含一定浓度 Cygb 和 TAT-Cygb 的无血清 DMEM 处理后的细胞免疫化学结果表明, Cygb 处理组细胞内 Cygb 含量与空白对照组相差不大, 细胞中含

有少量的内源性 Cygb 蛋白, 呈略微的淡棕黄色 (图 3A, 3B); 而 TAT-Cygb 处理组细胞与空白对照组和 Cygb 处理组相比, 着色程度明显加深, 说明穿膜肽 TAT 可以很好地运输 Cygb 进入细胞 (图 3C)。

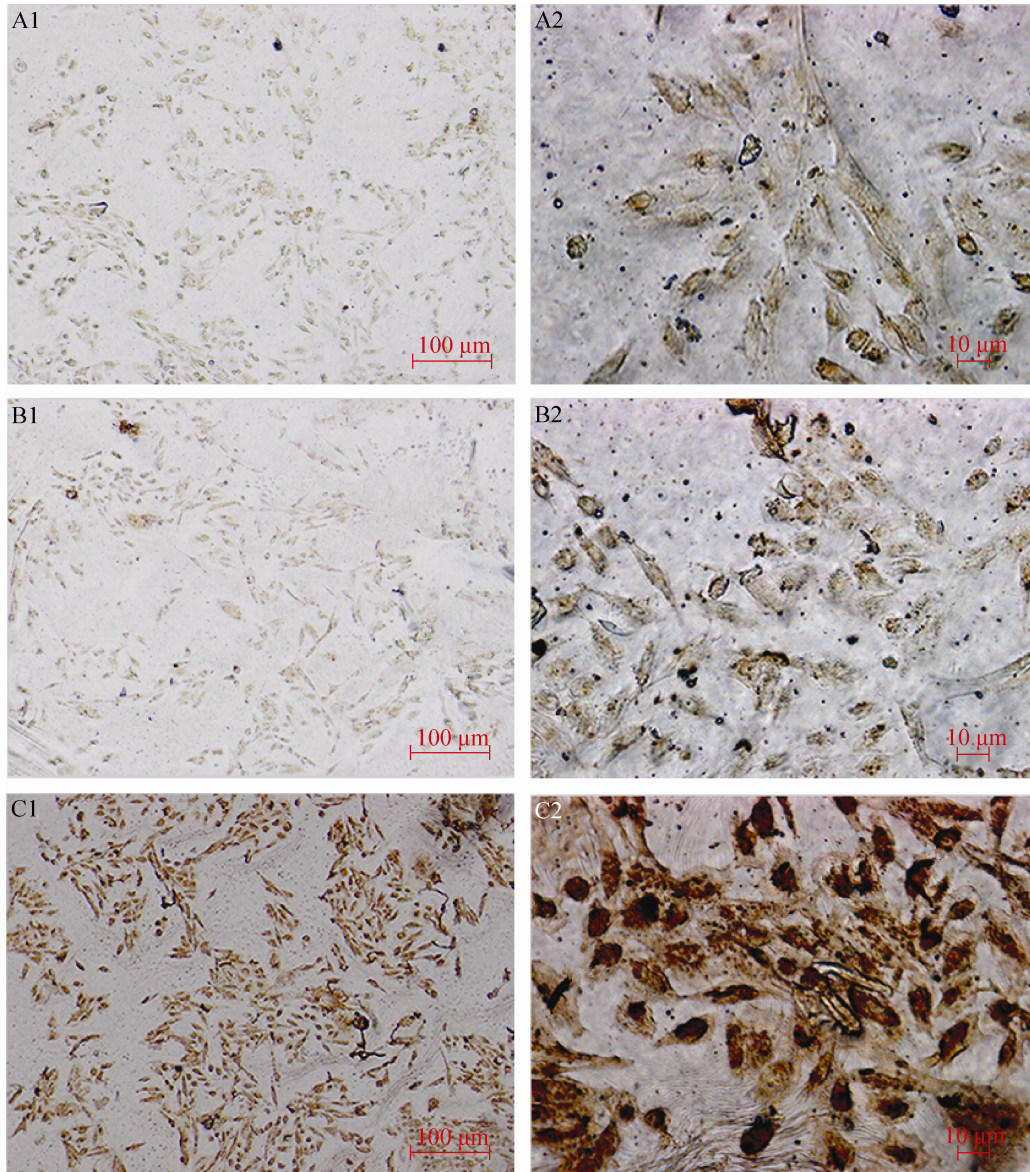


图 3 ICC 鉴定 TAT-Cygb 的穿膜作用

Fig. 3 Transmembrane ability of TAT-Cygb identified by immunocytochemistry. (A–C) The level of Cygb in Chang Liver. (A1, A2) control Chang Liver. (B1, B2) Chang Liver treated with Cygb. (C1, C2) Chang Liver treated with TAT-Cygb. (A1, B1, C1 magnification 10 $\times$ ; A2, B2, C2 magnification 40 $\times$ ).

## 2.4 活性分析

### 2.4.1 过氧化物酶活性测定

利用愈创木酚法测得纯化后的 TAT-Cygb 蛋白的过氧化物酶的比活为(422.30±0.36) U/mg。

### 2.4.2 TAT-Cygb 对人永生化角质细胞 Hacat 增殖的影响

如图 4 所示,随着作用于细胞的 TAT-Cygb 浓度增大,细胞相对增殖率呈小幅上升趋势,表明在一定浓度范围内,TAT-Cygb 不仅对 Hacat 细胞无毒性,还有助于提高细胞增殖能力。

### 2.4.3 TAT-Cygb 对氧化反应引起的细胞损伤的作用

如图 5 所示,200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  对 Hacat 细胞表现出明显的毒性,抑制率约 24%。在预处理 TAT-Cygb 和 Cygb 蛋白实验组中,高、低浓度的 TAT-Cygb 和 Cygb 蛋白都能在一定程度上保护细胞免受  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激损伤;在提前 30 min 加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理的治疗性实验组中,高、低浓度的 TAT-Cygb 蛋白能缓和  $\text{H}_2\text{O}_2$  对细胞造成的损伤,细胞相对增殖率分别为 98% 和 88% ( $P<0.01$ ),而加入 Cygb 蛋白的细胞相对增殖率仅为 79%,与  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激模型组相比未表现

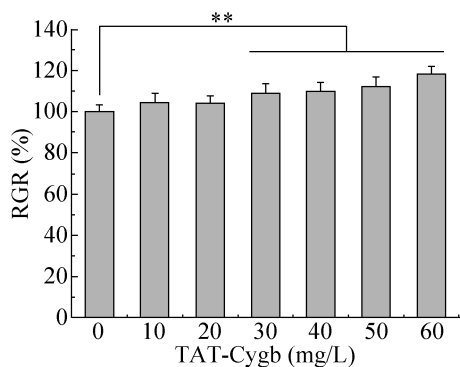


图 4 TAT-Cygb 蛋白对 Hacat 细胞增殖的影响

Fig. 4 Effects of TAT-Cygb protein on Hacat cell proliferation. \*\* $P<0.01$ .

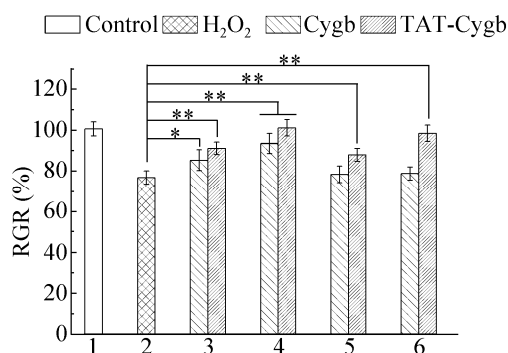


图 5 TAT-Cygb 蛋白的抗氧化作用

Fig. 5 The antioxidation of TAT-Cygb protein. 1: normal control; 2: 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 3: 20 mg/L protein before 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 4: 60 mg/L protein before 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 5: 20 mg/L protein after 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 6: 60 mg/L protein after 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

出显著性差异 ( $P>0.05$ )。这表明与 TAT-Cygb 相比, Cygb 由于缺乏主动进入细胞的能力,只能在预处理 Cygb 的情况下保护细胞,并不能治疗被  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 30 min 后损伤的细胞,而 TAT-Cygb 蛋白不仅可以保护细胞免受氧化攻击,还能穿透细胞屏障治疗已氧化损伤的细胞。

## 3 讨论

体外表达胞内 Cygb 已经有不少成功的报道<sup>[16-20]</sup>,但 Cygb 作为一种胞浆蛋白,尚缺乏进出细胞相应的主动运输机制<sup>[21-24]</sup>。本实验采用基因工程手段在 Cygb 蛋白上连接小分子穿膜肽 TAT,即可促使胞内蛋白 Cygb 穿透细胞膜进入胞内发挥生物学功能。通过构建 pET22b-TAT-Cygb/*E. coli* BL21 表达工程菌,采用廉价的乳糖诱导培养基成功诱导表达 TAT-Cygb 蛋白。由于 TAT 含有多个带正电的氨基酸,使得 TAT-Cygb 融合蛋白等电点升高,下游纯化非常方便,粗分离的蛋白只需经过一步 CM Sepharose Fast

Flow Protocol 层析就能得到纯度高达 95% 的目的蛋白。

因 TAT-Cygb 蛋白的融合性, 需要分别考察组成 TAT-Cygb 的蛋白或多肽部分的活性。只有确定了 TAT 能够将 Cygb 导入细胞, 才能考究 Cygb 对于细胞的作用。本实验首先利用 Western blotting 确定了 TAT-Cygb 能与 Cygb 抗体结合, 再通过免疫细胞化学实验证明了 TAT-Cygb 的穿膜能力。这在考察 TAT 穿膜能力的同时验证了 TAT-Cygb 中 Cygb 结构和功能的正确性。

Cygb 蛋白具有过氧化酶活性及氧自由基清除剂的作用。本课题组曾用重组 Cygb 蛋白作用于过氧化氢氧化应激损伤的肝星状细胞, 发现 Cygb 蛋白对氧化损伤细胞无明显治疗作用<sup>[7]</sup>, 推测 Cygb 蛋白因缺乏细胞表面受体或其他的主动运输机制, 较难被细胞吸收并在胞内发挥作用。因此, 本实验借助穿膜肽 TAT 的功能, 将 TAT-Cygb 融合蛋白作用于氧化损伤的人永生角质细胞 Hacat, 证明 TAT-Cygb 不仅可以保护细胞免受氧化应激的损伤, 还能治疗已损伤的细胞。这进一步验证了 TAT-Cygb 可以穿透细胞膜进入细胞发挥抗氧化的作用。

本实验创新性地将穿膜肽 TAT 与 Cygb 融合表达, 克服了胞内蛋白 Cygb 无法穿透细胞膜发挥生物学功能的难题, 使 Cygb 蛋白在胞内发挥抗氧化、消除自由基、增加胶原表达、促进新生血管生成和抗炎症等功能成为可能。本文为研究 Cygb 在抗氧化、抗炎症、抗肝纤维化和抗癌领域的作用和具体机制奠定了基础, 为加速药物新靶点开发提供了理论依据。

## REFERENCES

- [1] de Sanctis D, Dewilde S, Pesce A, et al. Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexacoordination. *J Mol Biol*, 2004, 336(4): 917–927.
- [2] Kawada N, Kristensen D, Asahina K, et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 2001, 276: 25318–25323.
- [3] Fordel E, Thijs L, Martinet W, et al. Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death. *Neurosci Lett*, 2006, 410: 146–151.
- [4] Fordel E, Thijs L, Moens L, et al. Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging. *FEBS J*, 2007, 274(5): 1312–1317.
- [5] Li D, Chen XQ, Li WJ, et al. Cytoglobin up-regulated by hydrogen peroxide plays a protective role in oxidative stress. *Neurochem Res*, 2007, 32: 1375–1380.
- [6] Fang J, Ma I, Allalunis-Turner J. Knockdown of cytoglobin expression sensitizes human glioma cells to radiation and oxidative stress. *Radiat Res*, 2011, 176: 198–207.
- [7] Lü YH, Wang QZ, Li ZF, et al. Role of cytoglobin in protecting hepatic stellate cells against oxidation induced damage. *Chin J Biotech*, 2011, 27(8): 1174–1182 (in Chinese).  
吕颖慧, 王启钊, 李招发, 等. 细胞珠蛋白对肝星状细胞氧化损伤的保护作用. *生物工程学报*, 2011, 27(8): 1174–1182.
- [8] Ezzat K, Zaghoul EM, El Andaloussi S, et al. Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and their stability in simulated gastric conditions. *J Control Release*, 2012, 162(1): 1–8.
- [9] Vivès E. Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: “is the Trojan horse to wild to go only to Troy?”. *J Control Release*, 2005, 109(1/3): 77–85.
- [10] Nasrollahi SA, Taghibiglou C, Azizi E, et al. Cell-penetrating peptides as a novel transdermal



- drug delivery system. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 80(5): 639–646.
- [11] Robinson C, Matos CF, Beck D, et al. Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808(3): 876–884.
- [12] Kaplan IM, Wadia JS, Dowdy SF. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*, 2005, 102(1): 247–253.
- [13] Ma X, Zheng W, Wei D, et al. Construction, expression, and purification of HIV-TAT-survivin (T34A) mutant: a pro-apoptosis protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, 47(1): 36–44.
- [14] Li ZF, Zhao XF, Zhang TT. A preliminary study of anti-aging and wound healing of recombination cytoglobin. *Acta Pharm Sin*, 2012, 47(1): 51–57 (in Chinese).  
李招发, 赵晓芳, 张亭亭. 重组细胞珠蛋白抗衰老及创伤愈合的初步研究. *药学学报*, 2012, 47(1): 51–57.
- [15] Li ZF, Deng XY, Xu JJ, et al. Protective effects of PEG modified recombinant cytoglobin on acute liver injury in mice. *Chin J Biotech*, 2012, 28(10): 1227–1235 (in Chinese).  
李招发, 邓小英, 许佳佳, 等. 聚乙二醇修饰重组细胞珠蛋白对小鼠急性肝损伤的保护作用. *生物工程学报*, 2012, 28(10): 1227–1235.
- [16] Wei W, Wu WT. Study on the bioactivity of recombinant human stellate cell activation-associated protein *in vitro*. *Pharm Biotech*, 2007, 14(6): 401–405 (in Chinese).  
魏威, 吴梧桐. 重组人源肝星状细胞激活相关蛋白体外生物活性的研究. *药物生物技术*, 2007, 14(6): 401–405.
- [17] Tian SY, Li LZ, Li HL, et al. Expression, purification and spectral characterization of recombinant human cytoglobin. *Chem J Chinese U*, 2009, 30: 483–488 (in Chinese).  
田素燕, 李连之, 李海丽, 等. 重组人细胞红蛋白的表达纯化及谱学表征. *高等学校化学学报*, 2009, 30: 483–488.
- [18] Zhang TT, Li ZF, Xu RA. Preparation, purification and activity of recombinant rat cytoglobin. *J Huaqiao Univ: Nat Sci*, 2009, 30(6): 671–675 (in Chinese).  
张亭亭, 李招发, 许瑞安. 重组大鼠细胞球蛋白的制备、纯化与活性. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2009, 30(6): 671–675.
- [19] Xu RA, Shi WJ. Recombinant human cytoglobin with TAT and its application in the treatment of liver cancer: CN, 101863985 B. 2012-12-26 (in Chinese).  
许瑞安, 施伟杰. 重组融合 Tat 人源细胞球蛋白及其在治疗肝癌中的应用: 中国, 101863985 B. 2012-12-26.
- [20] Jie ZW, Jia XJ, Qian J, et al. Study on purification and antioxidant activity of recombinant human cytoglobin. *Pharm Biotechnol*, 2010, 17(1): 45–49 (in Chinese).  
接振旺, 贾晓健, 钱杰, 等. 胞红蛋白表达纯化及抗氧化活性研究. *药物生物技术*, 2010, 17(1): 45–49.
- [21] Trent JT III, Hargrove MS. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem*, 2002, 277(22): 19538–19545.
- [22] Burmester T, Ebner B, Weich B, et al. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(4): 416–421.
- [23] Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, et al. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 8063–8069.
- [24] Shigematsu A, Adachi Y, Matsubara J, et al. Analyses of expression of cytoglobin by immunohistochemical studies in human tissues. *Hemoglobin*, 2008, 32(3): 287–296.

(本文责编 陈宏宇)