

### 【基础研究】

通信作者:李超堃(1978-),男,河南焦作人,博士,副教授,研究方向:离子通道结构功能与神经损伤;E-mail:lichaojun@hotmail.com

and  $(66.1 \pm 8.5)\%$  respectively. There was no statistic difference in the cell viability between the normal control group and normal transfection group ( $P > 0.05$ ); the cell viability in treatment group was significantly lower than that in the normal control group ( $P < 0.01$ ); the cell viability in treatment transfection group was significantly higher than that in the treatment group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The recombination protein  $\rho 2$  can through the membrane under the effect of Tat transduction peptide and can successfully establish a SH-SY5Y cell lines which transiently express recombinant protein  $\rho 2$ , which provide a new research method for the study of  $\rho 2$  subunit function.

**Key words:**  $\gamma$ -aminobutyric acid type C receptor;  $\rho 2$  subunits; prokaryotic expression; protien transfection

$\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 是中枢神经系统重要抑制性神经递质,通过对氯离子通道型  $GABA_C$  受体的作用,改变氯离子的通透性,引起细胞膜超极化<sup>[1]</sup>,进而抑制神经元兴奋。GABA 受体分为  $GABA_A$ 、 $GABA_B$  和  $GABA_C$  3 种亚型,其中  $GABA_A$  和  $GABA_C$  属于配体依赖性氯离子通道受体超家族。组成  $GABA_C$  受体的亚基主要有 3 个,分别为  $\rho 1$ 、 $\rho 2$  和  $\rho 3$ 。相对于  $GABA_A$  受体, $GABA_C$  受体对 GABA 更敏感,通道开放时间更持久,介导持久且缓慢的内向氯离子电流<sup>[2]</sup>。 $GABA_C$  受体对荷包牡丹碱和巴氯芬均不敏感,可受槲皮素及槲皮素苷调节<sup>[3]</sup>。近年国内外大量研究表明,脑缺血可引发中枢神经系统兴奋性毒性,尤其是谷氨酸的大量释放及累积是引起神经元损伤的重要原因<sup>[4-7]</sup>。 $GABA$  受体对缺血性脑损伤起着非常重要的保护作用<sup>[8]</sup>。研究证实,增强 GABA 受体活性可抑制脑缺血损伤释放的大量谷氨酸毒性作用,进而发挥抗脑缺血损伤作用<sup>[9-10]</sup>。因此, $GABA_C$  受体可作为缺血刺激和药物作用的重要靶标。本课题组研究发现,黄体酮等药物能够特异性结合  $GABA_C$  受体  $\rho 2$  亚基,进而干预 GABA 能信号传导<sup>[11-12]</sup>,推测  $GABA_C$  受体  $\rho 2$  亚基的激活可能在药物神经保护功能中发挥至关重要的作用。为进一步验证胞内  $GABA_C$  受体  $\rho 2$  高表达水平是否具有神经保护作用,本实验在体外合成重组蛋白  $GABA_C R \rho 2$ ,借助人类免疫缺陷病毒-1 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 的反义激活蛋白 (transactivator transcription, Tat) 介导重组蛋白的转运,构建一过性表达系统,为研究  $GABA_C$  受体  $\rho 2$  亚基功能奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** DH5 $\alpha$  感受态细胞、BL21 (DE3) PlysS 感受态细胞、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒、Bradford 蛋白定量试剂盒、His-tag、绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 一抗、碱性磷酸酶标记山羊抗鼠 IgG (H + L) 二抗均购于上海碧云天生物技术有限公司,2  $\times$  PCR Reagent 试剂购于天根生化科技 (北京) 有限公司,Phusion 超保真 DNA 聚合酶购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司,限制性内切酶 QuickCut *DpnI* 购于宝生物工

程 (大连) 有限公司,质粒提取试剂盒购于美国 OMEGA 生物公司,Ni-NTA Fast Start Kit 购于美国 QIAGEN 生物公司,胎牛血清购于美国 Hyclone 生物公司,高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、青-链霉素购于杭州吉诺生物医药技术有限公司,PCR 引物由上海 Invitrogen 生物公司合成,预染低分子量蛋白 Marker 购于上海索莱宝生物科技有限公司,人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组质粒 pET- $\rho 2$ -GFP-Tat 的构建** 以 pET30 DNA 为模版,pET30 上游引物为 5'-CATATG-TATATCTCCTTCT-3',下游引物为 5'-CACCACCT-GAGATCCGGCTGCTAAC-3'。利用快速克隆法<sup>[11]</sup>进行质粒构建,以获得 pET30 基因片段。PCR 扩增反应体系为:  $H_2O$  33  $\mu L$ , 5  $\times$  Phusion 扩增缓冲液 10  $\mu L$ , 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) 2  $\mu L$ , Phusion DNA 聚合酶 0.5  $\mu L$ , 上下游引物 (5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ) 各 1  $\mu L$ , pET30 DNA 模板 3  $\mu L$ , 总体积 50  $\mu L$ 。PCR 扩增反应条件为: 98  $^{\circ}C$  预变性 2 min; 98  $^{\circ}C$  变性 15 s; 58  $^{\circ}C$  复性 15 s; 72  $^{\circ}C$  延伸 3 min 50 s, 18 个循环; 再 72  $^{\circ}C$  延伸 5 min; 4  $^{\circ}C$  保存。抽取部分 PCR 产物利用体积分数 10  $g \cdot L^{-1}$  的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

以 pEGFP- $\rho 2$  质粒为模版, $\rho 2$  上游引物为 5'-GAAACGTCGTCAGCGTCGCCGTATGCCTATTTTAC-AAGACTC-3',下游引物为 5'-CCGGATCTCAGTGGT-GGTGGTGGTGGTGAACGGACTTCCGGCGTTTCA-3'。上、下游引物分别引入 Tat、His-tag 标签序列进行扩增以获得  $\rho 2$ -GFP-Tat 片段。PCR 扩增反应体系为:  $H_2O$  35  $\mu L$ , 5  $\times$  Phusion 扩增缓冲液 10  $\mu L$ , dNTP 2  $\mu L$ , Phusion DNA 聚合酶 0.5  $\mu L$ , 上下游引物各 (5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ) 1  $\mu L$ , DNA 模版 1  $\mu L$ , 总体积 50  $\mu L$ 。PCR 扩增反应条件为: 98  $^{\circ}C$  预变性 2 min; 98  $^{\circ}C$  变性 30 s; 55  $^{\circ}C$  复性 30 s; 72  $^{\circ}C$  延伸 3 min 30 s, 共 18 个循环; 72  $^{\circ}C$  再延伸 5 min; 4  $^{\circ}C$  保存。应用体积分数 10  $g \cdot L^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

将 PCR 产物各加 1  $\mu L$  *DpnI* 37  $^{\circ}C$  消化过夜, pET30 $\alpha$  骨架与  $\rho 2$ -GFP-Tat 片段按 1 : 1 比例混合<sup>[11]</sup>。转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,筛选 Kan<sup>+</sup> 抗体单

克隆,过夜、培养。取菌液行 PCR 鉴定重组质粒。测序上游引物为 5'-GTAGAGGATCGAGATCGA-3',下游引物为 5'-ATCCGGATATAGTTCCTC-3'。PCR 扩增反应体系为: H<sub>2</sub>O 7 μL, 2 × PCR Reagent 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 各 1 μL, 细菌液 1.5 μL, 总体积 20 μL。PCR 扩增反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 55 °C 复性 30 s; 72 °C 延伸 90 s, 25 个循环; 72 °C 再延伸 5 min; 4 °C 保存。扩增完成后, 进行体积分数 10 g · L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将阳性克隆菌液送于北京 Invitrogen 测序公司进行测序。重组质粒命名为 pET-ρ2-GFP-Tat 质粒, 测定质粒 DNA 浓度, 于 -20 °C 保存。

**1.2.2 重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 诱导表达及条件优化** 将 pET-ρ2-GFP-Tat 转化到 BL21 (DE3) PlysS 中, 待菌液在 600 nm 波长下的吸光度值达到 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol · L<sup>-1</sup> 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导蛋白表达, 分别于 37 °C 和 26 °C 诱导过夜。收集菌液于离心管中, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 1 min, 弃上清液, 加 200 μL 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬沉淀, 冰浴 20 min 后, 超声破碎 (6 s 超声 6 s 间隔), 至菌液澄清。将澄清液体在 4 °C 下 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 收集上清液即为可溶性蛋白。8 mol · L<sup>-1</sup> 尿素溶解沉淀, 冰浴 30 min, 于 4 °C 下 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取上清液即为包涵体蛋白。应用免疫印迹鉴定重组蛋白表达, 一抗为小鼠源 GFP 抗体 (1 : 1 000 稀释), 二抗为碱性磷酸酶 (Ap) 标记的山羊抗小鼠抗体 (1 : 1 000 稀释)。

**1.2.3 纯化重组蛋白 ρ2-GFP-Tat** 用上述方法诱导 200 mL 菌液, 表达并提取包涵体蛋白。用 His 标签亲和和层析柱进行蛋白质纯化, 5 mL 变性结合缓冲液平衡柱子后, 上样, 分别用 10 mL 变性结合缓冲液, 20 mL 变性洗涤缓冲液 (8 mol · L<sup>-1</sup> 尿素, pH 6.3), 2 mL 变性洗脱缓冲液 (8 mol · L<sup>-1</sup> 尿素, pH 4.5) 进行蛋白洗脱, 并收集流体。为得到较高纯度的重组蛋白, 将收集的 2 mL 流体挂柱, 再次进行离子交换层析, 然后, 取 5 cm 透析袋进行脱盐, 收集重组蛋白。分别取 10 μL 收集流体上样, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离和考马斯亮蓝染色, 鉴定重组蛋白表达纯化情况。

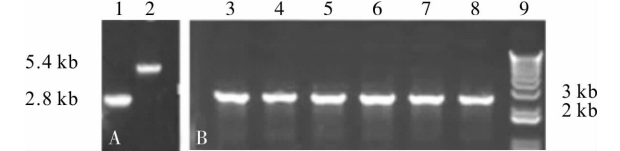
**1.2.4 重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 转染细胞** 将 SH-SY5Y 细胞接种于 3 cm 培养皿中培养, 待细胞密度达到约 80% 进行蛋白转染 (转染组)。用含 20 μg ρ2-GFP-Tat 重组蛋白的 1 mL 高糖 DMEM 孵育细胞 24 h。设置正常培养 SH-SY5Y 细胞为对照组。荧光显微镜下观察 Tat 介导重组蛋白 ρ2 的转染能力。

**1.2.5 重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 的活力检测** 胰蛋白酶消化 SH-SY5Y 细胞, 稀释细胞浓度为 5 × 10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板。按培养条件, 将细胞分为正常组和低氧低糖组。正常组又分为正常对照组和正常转染组。其中正常转染组进行 20 μg 重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 预孵育; 正常对照组更换等体积高糖培养基, 正常条件下培养。低氧低糖组又分为处理转染组和处理组, 处理转染组进行 20 μg 重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 预孵育; 处理组更换等体积新鲜低糖培养基。24 h 后, 2 组均给予细胞低氧低糖损伤处理 12 h。各组均更换含有 10 μL 细胞计数试剂盒溶液的新鲜培养基, 37 °C 孵育 1 h, 采用酶标仪在 450 nm 波长下检测各组细胞吸光度值。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 计量数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐者两两比较采用最小显著性差异法 *t* 检验, 方差不齐者采用 Games-Howell 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 重组质粒 pET-ρ2-GFP-Tat 构建** 经核酸电泳后, PCR 产物分别在 3 ~ 5 kb 和 2 ~ 3 kb 出现条带, 见图 1。其中, 泳道 1 在 2 ~ 3 kb 处出现与预期的 ρ2 基因片段 (2.8 kb) 大小相符的条带, 泳道 2 在 3 ~ 5 kb 处出现与预期 pET30 骨架片段 (5.4 kb) 大小相符的条带 (图 1A)。重组质粒后转化感受态细胞, 培养板长有 6 个单克隆菌落, 挑取菌落进行菌液 PCR, 结果显示, 菌液样品均在 2.8 kb 位置出现条带, 与预期基因片段大小相符, 电泳结果见图 1B。6 个克隆均为阳性克隆。菌液经测序证实重组质粒构建完成。



A: ρ2-GFP-Tat PCR 产物鉴定图; 1: ρ2-GFP-Tat; 2: pET30 质粒片段; B: 单克隆菌液 PCR 鉴定重组质粒 pET30-ρ2-GFP-Tat 图; 3 ~ 8: 6 个单克隆菌落的菌液 PCR 产物; 9: DNA marker。

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

**2.2 重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 的表达及条件优化** 运用 GFP 单克隆抗体进行菌体蛋白免疫印迹分析, 结果显示于泳道 2 和泳道 3 中可见相对分子质量 70 000 ~ 99 000 之间存在蛋白条带, 与预期大小为 79 000 的重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 大小相符。而泳道 4 和泳道 5 为不同温度条件下提取的可溶性蛋白, 经检测未发现蛋白条带。结果证实, 重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 主要以包涵体形式表达, 且在 26 °C 诱导温度下其表达量较高 (图 2)。

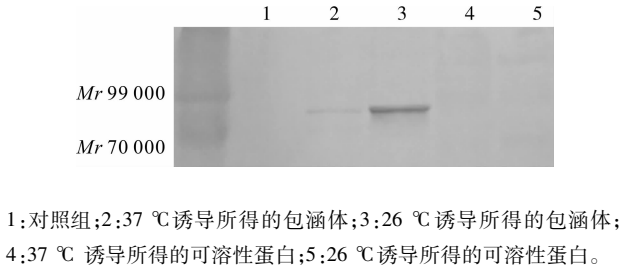


图 2 重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 表达

Fig. 2 Expression of the recombinant protein  $\rho 2$ -GFP-Tat

**2.3 重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 纯化** 蛋白电泳后考马斯亮蓝染色结果见图 3。重组蛋白相对分子质量为 79 000,蛋白条带清晰可见,表明了重组蛋白的成功表达和纯化。

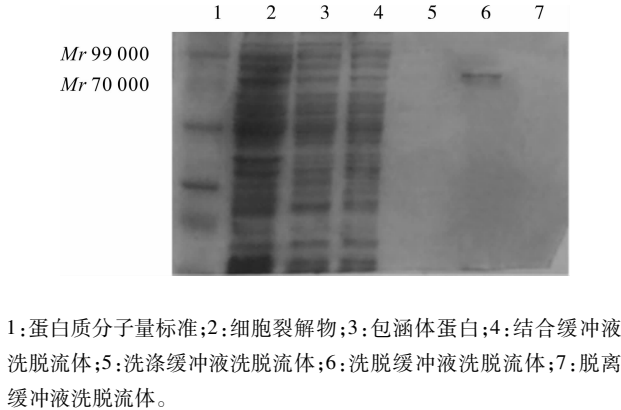
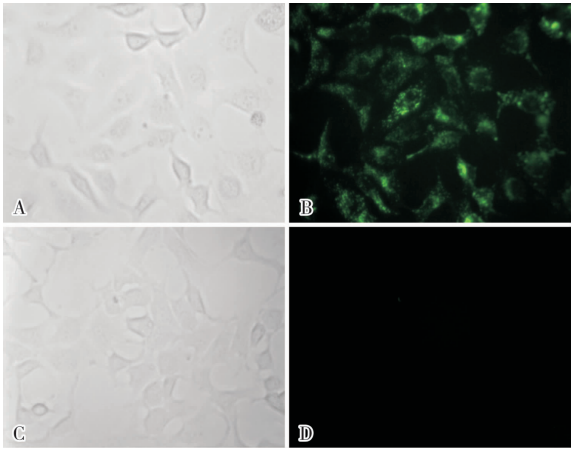


图 3 重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 的 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE figure of recombinant protein  $\rho 2$ -GFP-Tat

**2.4 重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 转染 SH-SY5Y 细胞** 经 PBS 洗涤后,转染重组蛋白的细胞在显微镜下可见到绿色荧光信号,且细胞核表现阴性荧光信号;对照组 SH-SY5Y 细胞无绿色荧光信号;见图 4。结果证实重组蛋白  $\rho 2$  在 Tat 信号肽介导下可穿透细胞膜,进入细胞。



A: 转染组细胞明视野图; B: 转染组细胞暗视野图; C: 正常组细胞明视野图; D: 正常组细胞暗视野图。

图 4 重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 转染 SH-SY5Y 细胞 (  $\times 400$  )

Fig. 4 Recombinant protein  $\rho 2$ -GFP-Tat infect SH-SY5Y cells (  $\times 400$  )

**2.5 重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 的活性评价** 正常对照组、正常转染组、处理组和处理转染组的细胞活力分别为 (  $100.0 \pm 6.9$  ) % 、 (  $89.3 \pm 3.6$  ) % 、 (  $51.4 \pm 3.6$  ) % 和 (  $66.1 \pm 8.5$  ) % 。正常对照组与正常转染组细胞活力比较差异无统计学意义 (  $P > 0.05$  ); 处理组细胞活力显著低于正常对照组 (  $P < 0.01$  ); 处理转染组细胞活力显著高于处理组 (  $P < 0.01$  ) 。

3 讨论

基因工程应用中常使用质粒或病毒进行转染细胞,该手段风险高,并且转染效率低,周期长。近年来,利用蛋白转导域辅助的蛋白质进行转导成为研究热点。其中,HIV-1 Tat 是由 11 个氨基酸组成的蛋白转导域,该蛋白域自 1998 年被发现后,已广泛应用于外源蛋白、DNA 或复合物透过细胞膜及血脑屏障的转导<sup>[12-13]</sup>。Tat 融合蛋白可引导不同蛋白质转导进入多种细胞,目前应用的细胞有外周血淋巴细胞、骨髓干细胞、交感神经瘤细胞等<sup>[14-17]</sup>。且 Tat 连接的相对位置对目的蛋白的二级结构及功能无影响<sup>[18]</sup>。Tat 介导神经珠蛋白可透过血脑屏障发挥其缺氧缺血脑损伤的保护作用<sup>[19]</sup>。白血病抑制因子受体  $\alpha$  亚基在 Tat 介导下透过生物膜,实现抑制急性粒细胞白血病细胞活性<sup>[20]</sup>。Tat 转导磷酸核糖基转移酶进入酶缺乏细胞,可有效治疗 Lesch-Nyhan 综合征<sup>[21]</sup>。以上研究充分证实了 HIV-1 Tat 具有广谱的蛋白转导作用,为异源蛋白质跨膜开辟了新途径。

GABA 受体家族中,GABA<sub>C</sub> 受体和 GABA<sub>A</sub> 受体均属于配体依赖性氯离子通道受体,可通过调节 GABA 能神经传递系统兴奋性/抑制性平衡从而维持中枢神经系统稳态<sup>[9]</sup>。体外细胞培养结果表明,氧糖剥夺后神经元细胞 GABA<sub>A</sub> 受体显著下降<sup>[22]</sup>。研究发现,药物可通过调节 GABA 受体的表达,发挥抗缺血再灌注脑损伤的保护作用<sup>[23]</sup>。在缺血脑损伤动物实验中,一些可促进 GABA 摄入或者激活 GABA<sub>A</sub> 受体的药物显示出一定的神经保护作用<sup>[24-25]</sup>。神经元细胞表面促离子型 GABA 受体及其功能的变化可作为关键因素决定神经元在缺血损伤中的最终命运。而目前关于  $\rho 2$  亚基功能的研究更多的是采用基因敲除<sup>[26]</sup>或质粒转染或药物激活/阻断<sup>[27-28]</sup>等手段,但存在耗时长、效率低等局限性。本研究利用 Tat 转导肽成功实现了  $\rho 2$  在 SH-SY5Y 细胞的转染,为后续干预研究提供新思路和技术手段。

本研究利用原核表达载体构建  $\rho 2$ -GFP-Tat 重组蛋白,为验证重组蛋白跨膜能力,对 SH-SY5Y 细胞进行重组蛋白转染。由于  $\rho 2$  末端融合了 GFP,经重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 转染后,发现细胞显示出绿色荧光信号。这证实了重组蛋白  $\rho 2$ -GFP-Tat 成功透

过胞膜进入人 SH-SY5Y 细胞。细胞活力检测结果显示,正常对照组、正常转染组、处理组和处理转染组细胞活力分别为  $(100.0 \pm 7.0)\%$ 、 $(89.3 \pm 3.6)\%$ 、 $(51.4 \pm 3.6)\%$ 、 $(66.1 \pm 8.5)\%$ 。正常条件下培养下重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 对细胞活力无影响,低氧低糖损伤后,处理转染组细胞活力明显高于处理组。这说明重组蛋白 ρ2-GFP-Tat 在缺氧损伤过程中能够一定程度上增强细胞活力。

本研究体外合成 ρ2 蛋白,并借助 Tat 转导肽对缺氧细胞进行转染,进而发挥其受体功能,增强细胞活力。本实验成功构建了重组蛋白 ρ2-GFP-Tat-His,表明可以利用原核体系表达融合蛋白 ρ2-GFP-Tat-His,在神经元缺氧损伤模型中构建 ρ2 一过性表达体系,提高其胞内表达水平,进而为研究 GABA<sub>C</sub> 受体参与神经损伤及药物干预机制提供新的实验手段,为干预神经疾病奠定理论基础。

**参考文献:**

[1] LAU B K,KARIM S,GOODCHILD A K,*et al.* Menthol enhances phasic and tonic GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents in midbrain periaqueductal gray neurons[J]. *Br J Pharmacol*,2014,171(11):2803-2813.

[2] NAFFAA M M,CHEBIB M,HIBBS D E,*et al.* Comparision of templates for homology model of ρ1 GABA<sub>C</sub> receptor;more insights to the orthosteric binding site's structure and functionality[J]. *J Mol Graph Model*,2015,62:43-55.

[3] KIM H J,LEE B H,CHOI S H,*et al.* Differential effects of quercetin glycosides on GABA<sub>C</sub> receptor channel activity[J]. *Arch Pharm Res*,2015,38(1):108-114.

[4] HUANG M,CHENG G,TAN H,*et al.* Capsaicin protects cortical neurons against ischemia/reperfusion injury via down-regulating NMDA receptors[J]. *Exp Neurol*,2017,295:66-76.

[5] MA X L,ZHANG F,WANG Y X,*et al.* Genistein inhibition of OGD-induced brain neuron death correlates with its modulation of apoptosis,voltage-gated potassium and sodium currents and glutamate signal pathway[J]. *Chem Biol Interact*,2016,254:73-82.

[6] 胡捷先. 脑缺血后谷氨酸通路及其调控的研究进展[J]. 复旦学报(医学版),2016,43(6):724-731.

[7] 武密山,赵素芝,高维娟,等. 升麻苷 H-1 对脑缺血大鼠纹状体氨基酸类神经递质含量的影响[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(5):831-835.

[8] OUYANG C,GUO L,LU Q,*et al.* Enhanced activity of GABA receptors inhibits glutamate release induced by focal cerebral ischemia in rat striatum[J]. *Neurosci Lett*,2007,420(2):174-178.

[9] MELE M,RIBEIRO L,INÁCIO A R,*et al.* GABA<sub>A</sub> receptor dephosphorylation followed by internalization is coupled to neuronal in *in vitro* ischemia[J]. *Neurobiol Dis*,2014,65:220-232.

[10] COSTA J T,MELE M,BAPTISTA M S,*et al.* Gephyrin cleavage in *in vitro* brain ischemia decreases GABA<sub>A</sub> receptor clustering and contributes to neuronal death[J]. *Mol Neurobiol*,2016,53(6):3513-3527.

[11] LI C,WEN A,SHEN B,*et al.* Fast cloning;a highly simplified, purification-free sequence-and ligation-independent PCR cloning method[J]. *BMC Biotechnol*,2011,11:92.

[12] WANG Y,FU L,LIU B,*et al.* Construction of human LRIG1-TAT-

fusions and TAT-mediated LRIG1 protein delivery[J]. *Biomed Pharmacother*,2015,69:396-401.

[13] ZOU S,FUSS B,FITTING S,*et al.* Oligodendrocytes are targets of HIV-1 tat:NMDA and AMPA receptor-mediated effect on survival and development[J]. *J Neurosci*,2015,35(32):11384-11398.

[14] GUO Q,ZHAO G,HAO F,*et al.* Effects of the Tat peptide orientation and relative location on the protein transduction efficiency[J]. *Chem Biol Drug Des*,2012,79(5):683-690.

[15] LIN B Y,KAO M C. Therapeutic applications of the Tat-meidated protein transduction system for complex I deficiency and other mitochondrial diseases[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2015,1350:17-28.

[16] ZHANG S,WANG W,PENG Y,*et al.* Amelioration of radiation-induced skin injury by HIV-Tat-mediated protein transduction of RP-1 from rana pleurade[J]. *Int J Med Sci*,2013,11(1):44-51.

[17] ZHENG L,HUI Q,TANG L,*et al.* Tat-mediated acidic fibroblast growth factor delivery to the dermis improves wound healing of deep skin tissue in rat[J]. *PLoS One*,2015,10(8):e0135291.

[18] YOO S Y,LE T K,JEONG J J,*et al.* Poligapolide, a PI3K/Akt inhibitor in immunodeficiency virus type 1 TAT-transduced CHME5 cells, isolated from the rhizome of polygala tenuifolia[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*,2014,62(5):467-471.

[19] YE Q,SUN Y,WU Y,*et al.* Pichia pastoris production of Tat-NGB and its neuroprotection on rat pheochromocytoma cell[J]. *Mol Biotechnol*,2016,58(1):22-28.

[20] 徐莎,王越,孙擎,等. TAT 介导的白血病抑制因子受体 α 亚基胞内远端融合蛋白的制备及其对 HL-60 细胞生长的抑制作用[J]. 解剖学杂志,2014,37(2):150-153.

[21] CATTELAN P,DOLCETTA D,HLADNIK U,*et al.* HIV-1 TAT-mediated protein transduction of human HPRT into deficient cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2013,441(1):114-119.

[22] RICCI L,VALOTI M,SGARAGLI G,*et al.* Protection by taurine of rat brain cortical slices against oxygen glucose deprivation-and reoxygenation-induced damage[J]. *Eur J Pharmacol*,2009,621(1/2/3):26-32.

[23] XIAO G,WEI J,YAN W,*et al.* Improved outcome from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury:a randomized controlled trial[J]. *Crit Care*,2008,12(2):R61.

[24] KELLEY M H,TAGUCHI N,ARDESHIRI A,*et al.* Ischemic insult to cerebellar Purkinje cells causes diminished GABA<sub>A</sub> receptor functionand allopregnanolone neuroprotection is associated with GABA<sub>A</sub> receptor stabilization[J]. *J Neurochem*,2008,107(2):668-678.

[25] LIANG R,PANG Z P,DENG P,*et al.* Transient enhancement of inhibitory synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons after cerebral ischemia[J]. *Neurosci*,2009,160(2):142-148.

[26] WANG J,MOJUMDER D K,YAN J,*et al.* *In vivo* electroretinographic studies of the role of GABA<sub>C</sub> receptors in retinal signal processing[J]. *Exp Eye Res*,2015,139:48-63.

[27] SMITH B J,CÔTÉ P D,TREMBLAY F. Dopamine modulation of rod pathway signaling by suppression of GABA<sub>C</sub> feedback to rod-driven depolarizing bipolar cells[J]. *Eur J Neurosci*,2015,42(6):2258-2270.

[28] VAVERS E,ZVEJNIECE L,SVALBE B,*et al.* The neuroprotective effect of R-phenibut after focal cerebral ischemia[J]. *Pharmacol Res*,2016,113(Pt B):796-801.