PTD-SOD 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护和修复作用研究

叶南慧，林艳云，刘树滔，饶平凡*(福州大学生物工程与科学学院，福州 350002)

摘要：目的 研究 PTD-SOD 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护和修复作用。**方法** 建立 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤模型，采用 MTT 法检测融合蛋白 PTD-SOD 对细胞存活率的影响，LDH 释放分析检测 PTD-SOD 对细胞损伤后的保护作用及损伤后细胞内氧化与抗氧化水平的变化。**结果** 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤，MTT 活性检测、LDH 分析及氧化与抗氧化水平分析都表明 PTD-SOD 能明显提高细胞存活率和细胞内抗氧化能力。**结论** PTD-SOD 融合蛋白能保护 $Na_2S_2O_4$ 诱导缺氧损伤的 SH-SY5Y 细胞，具有抑制细胞死亡，改善损伤细胞内抗氧化能力。

关键词：融合蛋白；自由基；缺氧损伤；人神经母细胞瘤细胞；抗氧化

中图分类号：R965.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-7693(2013)01-0131-05

Protective Effects of PTD-SOD Fusion Protein on SH-SY5Y Cell Induced by Sodium Dithionite Sodium Hydrosulfite

YE Nanhui, LIN Yanyun, LIU Shutao, RAO Pingfan*(*Institute of Biotechnology, Fuzhuo University, Fuzhou 350002, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protection mechanism of fusion protein PTD-SOD on SH-SY5Y cell against toxicity induced by sodium dithionite sodium hydrosulfite. **METHODS** Establish the hypoxia damage model of SH-SY5Y cell induced by $Na_2S_2O_4$. MTT assay was used to measure the survival of SH-SY5Y cell. LDH, SOD and MDA were measured by spectrophotometric method to analysis the protective effect of PTD-SOD on SH-SY5Y cell and the change of the cell oxidation and antioxidant levels after the hypoxia damage. **RESULTS** MTT assay demonstrated that PTD-SOD could promote significantly the survival of the cell. LDH release assay and SOD and MDA assay demonstrated that PTD-SOD could promote the levels of antioxidant against the hypoxia damage. **CONCLUSION** The fusion protein PTD-SOD protects SH-SY5Y cell from death after injury induced by $Na_2S_2O_4$ and promotes antioxidant ability in cell.

KEY WORDS: fusion protein; free radical; hypoxia damage; SH-SY5Y; antioxidant ability

SH-SY5Y 细胞来源于人神经母细胞瘤株，具有与神经元细胞相类似的形态和生理生化特征，增殖快，可连续稳定传代，是目前进行体外神经系统研究的常用细胞株[1]。神经元发生不可逆损伤是导致缺血性脑卒中的重要病理环节，其发生与氧自由基有着密切联系。自由基引起的脂质过氧化链式反应加剧神经元凋亡和坏死，加重脑组织缺血性损伤，但其作用机制尚不明确[2]。目前，临床上治疗缺血性脑卒中的手段之一是清除自由基，切断自由基对脑缺血的继发性损害。超氧化物岐化酶(superoxide dimatase，SOD)可以催化超氧阴离子自由基转化为过氧化氢和分子氧，在抵御氧自由基导致的细胞损伤中起着关键作用[3]。SOD 分子量在 32 kDa 左右，属于生物大分子，很难通过细胞膜进入胞内发挥作用。由蛋白质转导域(protein transduction domain，PTD)介导的蛋白转导技术的应用，为多肽、蛋白及 DNA 分子进入细胞提供了可能。有研究表明，PTD 转导融合蛋白可通过血脑脊液屏障且不损伤细胞[4-6]。PTD 的穿膜特性为脑中风中神经细胞凋亡及神经退行性疾病的干预提供了有效的治疗方法[6]。本课题组于 2005 年成功表达 PTD- SOD 融合蛋白[7-8]，并发现 PTD-SOD 能够进入各种细胞内提高胞内的 SOD 含量[9-11]。而后研究中利用荧光标记的方法进一步研究证实了 PTD-SOD 能够转导进入到细胞内以及 PTD-SOD 转导能力与转导时间和转导浓度之间存在的关系[12]。本实验在此研究基础上对人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)进行体外培养，采用 $Na_2S_2O_4$ 诱导 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤，通过观察不同浓度 PTD-SOD 与不同孵育时间对 SH-SY5Y 细胞存活率、LDH 漏出率及抗氧化水平的影响，探讨 PTD-SOD 对 SH-SY5Y

作者简介：叶南慧，女，博士生 Tel: (0591)83732462 E-mail: yenanhui@yahoo.cn *通信作者：饶平凡，男，博导，教授 Tel: (0591)83732462 E-mail: pingfanrao@gmail.com

细胞缺氧损伤的保护作用和机制。

1 材料

1.1 细胞与试剂

人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)由福建医科大学惠赠；PTD-SOD 冻干粉(福州大学生物工程研究所研制)；连二亚硫酸钠($Na_2S_2O_4$，中国医药集团，分析纯)用无菌 PBS 配制成浓度为 7.5 mmol·L^{-1} 的 $Na_2S_2O_4$ 溶液，临用前配制；细胞培养液采用 DMEM 培养液(Sigma 公司)；10%小牛血清(Hyclone 公司)；细胞裂解液(RIPA，碧云天)；细胞超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 仪器

Lamada bio10 型紫外可见分光光度计(美国 PE 公司)；1285 型超净工作台(美国 Thermo Forma 公司)；MS2 型漩涡振荡器(德国 IKA 公司)；Sonic-vc-750 型超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司)；CO_2 培养箱(美国 Thermo Forma 公司)；37XA 型倒置显微镜(上海仪器厂)；MK3 型酶联免疫检测仪(美国雷勃)。

2 方法

2.1 SY5Y 细胞复苏与传代培养

将冻存的 SH-SY5Y 细胞株从–196 ℃液氮罐中取出，迅速投入 37~40 ℃水中，在 1 min 之内融化。将细胞悬液移至 15 mL 离心管中，加入 10 倍体积的无血清 DMEM 培养基洗一次，加入含 10%小牛血清的 DMEM 培养基，接种于 100 mL 培养瓶中，送入 5%CO_2 培养箱中培养。显微镜下观察细胞汇合率达到 70%以上时进行传代。弃去培养基，用无血清培养液洗细胞一次，加入 0.125%胰酶 1 mL 于瓶中，轻轻覆盖瓶底，镜下观察细胞突触回缩变圆时(约 1~2 min)，吸弃胰酶，马血清终止消化。收集细胞悬液，离心弃上清，留细胞液数毫升，计数，稀释至适合浓度，接种于 25 mL 培养瓶中。

2.2 建立 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤模型

对数生长期细胞，消化后充分吹打成单细胞悬液，计数后稀释成 1×10^5 个·mL^{-1}，接种到 96 孔培养板中(每孔 100 μL)后放入培养箱培养 24 h。取出 96 孔板，吸去培养基，用无菌 PBS 清洗 3 次，每孔加入 100 μL 7.5 mmol·L^{-1} $Na_2S_2O_4$ 溶液，放入培养箱中培养 2 h 后取出，吸去 $Na_2S_2O_4$ 溶液，更换为无血清培养基造成细胞缺氧损伤，放入培养箱中继续培养 24 h。

2.3 不同浓度 PTD-SOD 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤保护与修复的影响

PTD-SOD 冻干粉用 DMEM 培养液配制成 125，250，500，1 000，2 000 U·mL^{-1} 的浓度。按“2.2”项下方法建立 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤模型。同时设立空白对照组和缺氧模型组，即不加入药物干预，不进行缺氧损伤的正常组和不加入药物干预但进行缺氧损伤的模型组。吸取不同浓度 PTD-SOD(每孔 100 μL)分别在细胞缺氧损伤造模之前与之后同细胞共孵育 2 h 后，吸去 PTD-SOD 溶液，更换无血清 DMEM 培养液。用 MTT 法测定细胞的吸光度值，计算细胞存活率。MTT 法测定细胞的存活率，即将 96 孔板中培养基移去，加入 1 mg·mL^{-1} 的 MTT 溶液 50 μL，37 ℃孵育 3 h 后，弃去上清液，每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)，微量振荡仪振荡 15 min，待结晶完全溶解后，酶联免疫检测仪测 590 nm 处吸光度值。存活率/%=$(A_{590}-B_{590})/(C_{590}-B_{590})\times100\%$，其中：$A_{590}$：测试样品的吸光值；$B_{590}$：空白样(仅有 DMSO)的吸光值；$C_{590}$：空白样(未经处理)的吸光值。

2.4 不同孵育时间对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护与修复作用的影响

分别在建立 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤造模之前和之后将 SH-SY5Y 细胞与 500 U·mL^{-1} 浓度的 PTD-SOD 共孵育 0.5，1，1.5，2，2.5，3 h。用 MTT 法测定细胞的吸光度值，计算细胞存活率。实验方法同上。

2.5 PTD-SOD 对 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤的 LDH 活性的影响

在 SH-SY5Y 细胞造成缺氧损伤后，换含有不同的浓度 PTD-SOD 的 DMEM 培养液(125，250，500，1 000，2 000 U·mL^{-1})与 SH-SY5Y 细胞共孵育 2 h 或将浓度为 500 U·mL^{-1} 的 PTD-SOD 溶液与 SH-SY5Y 细胞共孵育不同时间(0.5，1，1.5，2，2.5，3 h)，再换成无血清 DMEM 溶液继续培养 24 h；收集上清液，按照乳酸脱氧酶(LDH)试剂盒说明测定 LDH 的活性，以 LDH 活性代表 LDH 的漏出率；LDH 释放率按如下公式计算：抑制率/%=(LDH 模型组–LDH 给药组)/(LDH 模型组–LDH 空白组)×100%。

2.6 PTD-SOD 对 SH-SY5Y 细胞缺氧损伤的 SOD 活性和 MDA 含量的影响

将 SH-SY5Y 细胞按 2×10^4 个·mL^{-1} 接种于 6 孔培养板中培养 24 h。按“2.2”项下方法建立细胞缺氧损伤模型后，换含有 500 U·mL^{-1} 浓度的 PTD-SOD 的 DMEM 培养液，分别孵育 1，2 和 3 h，再换成无血清 DMEM 培养液继续培养 24 h；每孔加入细胞裂解液 150 μL，离心取上清液，按 SOD 和 MDA 试剂盒说明测定 SOD 活力和 MDA 含量。

2.7 统计学分析

采用 EXCEL 统计软件作方差分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 PTD-SOD 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护与修复作用的影响

加入 7.5 mmol·L^{-1} $Na_2S_2O_4$ 溶液作用 2 h 后，SH-SY5Y 细胞的存活率明显下降，仅为对照组的 51.9%，而预先加入 PTD-SOD 各浓度组中 250，500，1 000 U·mL^{-1} 保护组与模型组比较有显著性差异($P<0.01$)，其中当 PTD-SOD 浓度为 500 U·mL^{-1} 时，细胞存活率出现最大值，为 62.4%；随着 PTD-SOD 浓度的增大，细胞存活率出现下降的趋势，当 PTD-SOD 保护组浓度达到 2 000 U·mL^{-1} 时，细胞存活率低于模型组。对于 $Na_2S_2O_4$ 引起的细胞损伤，PTD-SOD 可起到良好的修复作用。各浓度 PTD-SOD 修复组与模型组比较均有极显著性差异($P<0.01$)，随着 PTD-SOD 浓度的增大，细胞存活率有明显的提高，其中当 PTD-SOD 浓度达到 500 和 1 000 U·mL^{-1} 时，SH-SY5Y 细胞的存活率分别达到 71.6%和 72.6%。随着 PTD-SOD 浓度的继续增大，细胞存活率呈平稳趋势。修复各浓度组与保护各浓度组相比，细胞存活率有了明显的提高，说明 PTD-SOD 各浓度组修复效果优于预防效果。结果见图 1。

3.2 不同孵育时间对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护与修复作用的影响

加入 7.5 mmol·L^{-1} $Na_2S_2O_4$ 溶液作用 2 h 后，模型组细胞的存活率下降为 50.9%。而预先加入浓度为 500 U·mL^{-1} PTD-SOD 各时间组除孵育时间为 0.5 h 组与模型组比较无显著性差异外，其余各组与模型组相比具有极显著性差异($P<0.01$)；随着共孵育时间的延长，细胞存活率有所提高，存活率最高达到 59.8%；SH-SY5Y 细胞损伤后，与 PTD-SOD 共孵育不同时间组与模型组相比具有极显著性差异($P<0.01$)；随着共孵育时间的延长，细胞存活率有上升的趋势；当共孵育时间达到 2 h 后，细胞存活率达到 80.0%；修复各孵育时间组与保护各孵育时间组相比，细胞存活率有了明显的提高，说明 PTD-SOD 各孵育时间组修复效果优于预防效果。结果见图 2。

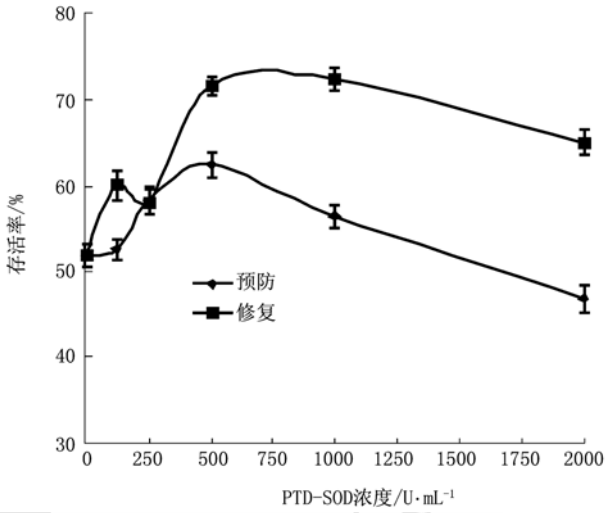

图 1 不同浓度 PTD-SOD 对 SH-SY5Y 细胞损伤的保护与修复作用的影响(n=8，$\bar{x}\pm s$)

Fig 1 Protective and repairing effects of PTD-SOD on the livability of SH-SY5Y cell injured by $Na_2S_2O_4$ (n=8，$\bar{x}\pm s$)

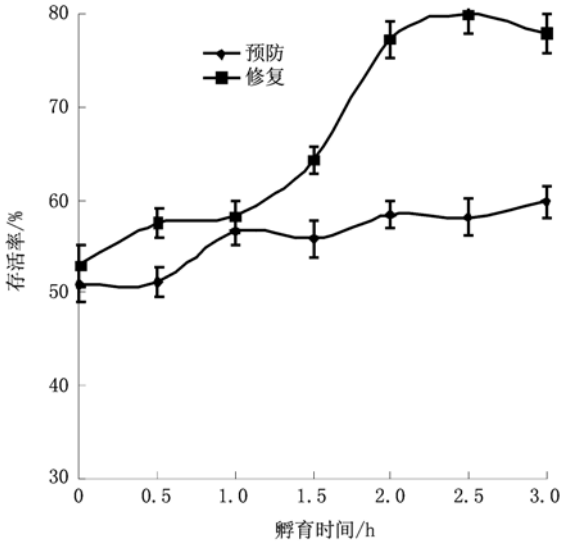

图 2 不同孵育时间对 SH-SY5Y 细胞损伤的保护与修复作用的影响(n=8，$\bar{x}\pm s$)

Fig 2 Protective and repairing effects of different incubating time with PTD-SOD on the livability of SH-SY5Y cell injured by $Na_2S_2O_4$(n=8，$\bar{x}\pm s$)

3.3 PTD-SOD 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤修复作用的 LDH 分析

细胞受损时会释放出 LDH，培养基上清液中的 LDH 水平反映细胞受损或死亡程度。SH-SY5Y 细胞受损后，培养液中的 LDH 含量明显增加；LDH 释放量随着 PTD-SOD 浓度的增加而降低，与模型组相比均有显著性差极($P<0.01$)；其中当 PTD-SOD 浓度达到 500 $U\cdot mL^{-1}$ 时，继续增加浓度，其抑制率趋于稳定；当 PTD-SOD 浓度达到 1 000 $U\cdot mL^{-1}$ 时，其抑制率达到 35.3%，结果见表 1。SH-SY5Y 细胞损伤后，与 PTD-SOD 共孵育不同时间组除共孵育时间 0.5 h 组外其余各组均与模型组相比有极显著性差异($P<0.01$)；随着共孵育时间的延长，LDH 释放量明显降低，当共孵育时间达到 2 h 后，继续延长共孵育时间，其抑制率趋于稳定；可见，PTD-SOD 对损伤具有明显的保护作用，能降低培养液上清中 LDH 活力，降低细胞死亡率，结果见表 2。

3.4 PTD-SOD 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量的影响

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶，对机体的氧化还原平衡起着调控作用。MDA 是细胞脂质氧化最重要的产物，因此测定胞内 SOD 的活力与 MDA 的含量可以间接测定细胞内抗氧化能力与受氧化程度。SH-SY5Y 细胞受损后，胞内 SOD 活力明显降低，MDA 含量明显增加。加入不同浓度的 PTD-SOD 干预后，可明显降低胞内 MDA 含量，提高 SOD 活力；当 PTD-SOD 浓度达到 500 和 1 000 $U\cdot mL^{-1}$ 时，与模型组相比，SOD 活力和 MDA 含量有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。SH-SY5Y 细胞受损后，用含浓度 500 $U\cdot mL^{-1}$ PTD-SOD 的 DMED 培养基与细胞共培养，随着孵育时间的延长，胞内 SOD 活力明显提高，MDA 含量明显降低，其中孵育时间为 2 h 和 3 h 组与模型组相比有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，结果见表 3。结果表明，PTD-SOD 可以增加受损细胞内 SOD 活力和降低 MDA 含量，提高机体的抗氧化水平。

表 1 不同浓度的 PTD-SOD 对 SH-SY5Y 细胞 LDH 漏出率和释放抑制率的影响($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of PTD-SOD on activity level of LDH and release inhibitory in SH-SY5Y cell injured by $Na_2S_2O_4$($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	给药浓度/ $U\cdot mL^{-1}$	$Na_2S_2O_4$/ $mmol\cdot L^{-1}$	LDH 浓度/ $kU\cdot mL^{-1}$	释放抑制率/%
对照组	0	0	2.68±0.20	–
模型组	0	7.5	5.94±0.29	0
PTD-SOD 组	125	7.5	5.06±0.26[1)]	27.00
PTD-SOD 组	250	7.5	5.19±0.31[1)]	23.00
PTD-SOD 组	500	7.5	4.84±0.35[1)]	32.50
PTD-SOD 组	1 000	7.5	4.79±0.37[1)]	35.30
PTD-SOD 组	2 000	7.5	4.80±0.27[1)]	34.90

注：与模型组比较，[1)]$P<0.01$

Note: Compared with model group, [1)]$P<0.01$

表 2 不同孵育时间对 SH-SY5Y 细胞 LDH 漏出率和释放抑制率的影响($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of different incubating time with PTD-SOD on activity level of LDH and release inhibitory in SH-SY5Y cell injured by $Na_2S_2O_4$($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	孵育时间/h	$Na_2S_2O_4$/ $mmol\cdot L^{-1}$	LDH 浓度 /$kU\cdot mL^{-1}$	释放抑制率/%
对照组	0	0	2.29±0.17	–
模型组	0	7.5	6.18±0.23	0
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	0.5	7.5	5.92±0.32[1)]	6.70
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	1.0	7.5	5.58±0.25[2)]	15.40
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	1.5	7.5	5.33±0.20[2)]	21.80
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	2.0	7.5	5.08±0.25[2)]	28.30
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	2.5	7.5	4.96±0.28[2)]	31.40
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	3.0	7.5	4.93±0.22[2)]	32.10

注：与模型组比较，[1)]$P<0.05$, [2)]$P<0.01$

Note: Compared with model group, [1)]$P<0.05$, [2)]$P<0.01$

表 3 PTD-SOD 对 $Na_2S_2O_4$ 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of PTD-SOD on activity level of SOD and content of MDA in SH-SY5Y cell injured by $Na_2S_2O_4$($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	$Na_2S_2O_4$/ $mmol\cdot L^{-1}$	SOD/$U\cdot mL^{-1}$		MDA/$nmol\cdot mL^{-1}$	
		不同浓度	不同孵育时间	不同浓度	不同孵育时间
对照组	0	68.34±6.92	65.23±8.74	14.06±2.48	12.54±2.79
模型组	7.5	44.16±4.23	40.63±6.06	23.14±3.72	18.96±3.73
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	7.5	51.76±4.96	45.63±7.44	22.06±3.68	16.58±2.73
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	7.5	62.00±5.99[2)]	48.92±6.91[1)]	17.70±2.44[1)]	12.43±2.08[2)]
PTD-SOD 500 $U\cdot mL^{-1}$ 组	7.5	59.79±4.30[2)]	52.36±5.38[2)]	17.60±2.61[1)]	12.58±3.39[1)]

注：与模型组比较，[1)]$P<0.05$, [2)]$P<0.01$

Note: Compared with model group, [1)]$P<0.05$, [2)]$P<0.01$

4 讨论

本试验采用体外培养SH-SY5Y细胞，利用$Na_2S_2O_4$能迅速清除培养基中的氧且不会对细胞膜造成损伤的特性[13]，用浓度为7.5 mmol·L^{-1} $Na_2S_2O_4$溶液培养2 h建立SH-SY5Y细胞缺氧损伤模型，此方法诱发的神经细胞缺氧损伤可行性较好，稳定性较强，操作简便。神经细胞缺氧时释放出大量的自由基，造成细胞内钙超载、NO释放、膜脂质过氧化损伤等一系列病理反应，最终造成神经元凋亡和坏死。本实验用经典的MTT法检测细胞存活率，结果证实PTD-SOD能有效地和抑制$Na_2S_2O_4$诱导的细胞死亡，在PTD-SOD浓度达到500 U·mL^{-1}与细胞共孵育2 h时即可有效地保护和修复细胞。实验还表明，PTD-SOD的修复作用要优于保护作用，PTD-SOD对受损细胞的修复率最高可达到32.0%左右。LDH是细胞质膜标记酶，当神经细胞受损时会释放出LDH，神经细胞损伤程度与LDH漏出率成正比，故测定培养基中LDH活性是反映细胞死亡常用的生化指标[14-15]。本实验结果表明，模型组SH-SY5Y细胞培养液中的LDH漏出率明显高于对对照组，而给予PTD-SOD干预后，培养液上清中的LDH显著减少，当PTD-SOD浓度达到500 U·mL^{-1}与细胞共孵育2 h时，其抑制LDH释放效果最佳。本实验结果提示，PTD-SOD可减轻$Na_2S_2O_4$所致的细胞膜损伤，对受损SH-SY5Y细胞具有修复作用。神经组织对自由基引起的损伤特别敏感，各种自由基产生的氧化应激可导致神经系统功能紊乱。自由基对机体的损伤是由于分子中含有性质活泼的不配对电子，最易与脂质特别是细胞膜上的不饱和脂肪酸反应使其发生过氧化，使得MDA含量升高，并消耗SOD使其活性下降[16]。本实验结果表明，SH-SY5Y细胞缺氧损伤后，模型组中的SOD活力明显降低，MDA水平明显升高。在给予不同浓度PTD-SOD和同一浓度PTD-SOD不同共孵育时间干预后，SOD活力水平明显增加，MDA含量明显降低，这和以上的实验结果相一致，提示了PTD-SOD能够减少缺氧损伤引起的自由基含量，提高细胞内SOD的活力并降低MDA的含量。总之，PTD-SOD对$Na_2S_2O_4$诱导的SH-SY5Y细胞损伤具有良好的保护和修复作用，抑制细胞的死亡率和LDH漏出率，提高细胞内抗自由基能力，为临床上治疗缺血性脑卒中等脑血管疾病提供实验依据。

REFERENCES

[1] ZHU W, BIJUR G N, STYLES N A, et al. Regulation of FOXO3a by brain derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 126 (1): 45-56.

[2] AYER R E, ZHANG J H. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm [J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 104(2): 33-41.

[3] TAKEMURA S, KAYAMA T, KUGE A, et al. Correlation between copper/zinc superoxide dismutase and the proliferation of neural stem cells in aging and following focal cerebral ischemia [J]. J Neurosurg, 2006, 104(1): 129-136.

[4] BRLLKS H, LEBLEN B, VIVES E. Tat peptide-mediated cellular delivery: Back to basics [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(4): 559-577.

[5] XU C, ZHANG Y, JIANG H. Ex vivo expansion of hemapoietic stem cell by fusion protein TAT-Zfx [J]. Biochem BiophysRes Commun, 2009, 379(3): 771-774.

[6] YOSHIDAWA T, SGGITA T, MUKAI Y, et al. Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus [J]. J Mol Biol, 2008, 380(5): 777-782.

[7] CHEN C. Cu, Zn-superoxide dismutase mediated by an TAT-PTD: expression, purification and characterization [D]. Fujian: University of Fuzhou, 2005.

[8] CHEN J, LIU S T, RAO P F, et al. The transmembrane activity of the PTD of Tat protein fused at the carboxyl-terminus of GFP *in vivo* [J]. J Fuzhou Univ (福州大学学报), 2006, 34(2): 301-304

[9] ZHANG C. Anti-irradiation capacity of fusion protein PTD-SOD with membrance transduction [D]. Fujian: University of Fuzhou, 2007.

[10] CHEN J. The study of the transmembrane activity of the PTD of Tat protein fused at the Carboxy1-terminus of heterologous protein [D]. Fujian: University of Fuzhou, 2005.

[11] CHEN H. Purification, physical-chemical properties and cell activity of the fusion protein of Cu,Zn-superoxide dismutase and TAT-PTD [D]. Fujian: University of Fuzhou, 2006.

[12] ZHAO H Q. The effect of anti-oxide profile on proliferation of hepatoma cell [D]. Fujian: University of Fuzhou, 2009.

[13] XU S M, WANG P Y, MA H Y. Preparation of hypoxic surroundings with sodium dihionite for cell culture [J]. Acta Acad Med Mil Tert (第三军医大学学报), 2005, 27(4): 359-360.

[14] GUO C P, DONG X L, MING L Q. The effect of ischemic preconditioning on lactate dehydrogenase and creatine kinase following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Chin J Cerebrovasc Dis(中国脑血管病杂志), 2007, 4(8): 374-377.

[15] TAGLIARI B, ZAMIN L L, SALBEGO C G, et al. Homocysteine increases neuronal damage in hippocampal slices receiving oxygen and glucose deprivation [J]. Metab Brain Dis, 2006, 21(4): 273- 278 .

[16] HUA J S, LI L P, ZHU X M. Effects of moxibustion preconditioning on SOD and MDA in rats with global brain ischemia [J]. Chin Acupunct Moxib(中国针灸), 2006, 26(8): 595-597.

收稿日期：2010-11-17