

重组 PTD-maxadilan 的制备与鉴定

曾乐¹, 余榕捷¹, 徐明芳², 陈建苏³, 王静静¹, 李娟¹

1 暨南大学生物工程研究所, 广州 510632

2 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632

3 暨南大学医学院眼科, 广州 510632

摘要: 为了构建能够有效进入血脑屏障的新型融合蛋白 PTD-maxadilan(PTD-MAX), 设计编码融合蛋白 PTD-MAX 基因, 克隆到表达载体 pKYB, 构建重组表达载体 pKYB-PTD-MAX, 转化大肠杆菌 ER2566 中。采用 IPTG 诱导由 PTD-MAX、内含肽和几丁质组成的融合蛋白的表达。利用 IMPACT(Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)介导的纯化系统制备目的融合蛋白 PTD-MAX。所得的目的蛋白经激光飞行质谱测定分子量, 结果与理论值相符。动物实验结果表明融合蛋白 PTD-MAX 能够有效穿越血脑屏障, 重组 PTD-MAX 具有比天然 maxadilan 更显著($P<0.05$)的抑制小鼠摄食的作用。融合蛋白 PTD-MAX 的构建和制备为其生物学功能的深入开发奠定了基础。

关键词: PTD-MAX, maxadilan, 内含肽, 血脑屏障

Preparation and identification of recombinant PTD-maxadilan

Le Zeng¹, Rongjie Yu¹, Mingfang Xu², Jiansu Chen³, Jingjing Wang¹, and Juan Li¹

1 Bioengineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Life Science Department, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3 Ophthalmology Department, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: In order to construct a novel fusion protein PTD-maxadilan (PTD-MAX) that can enter the blood-brain barrier (BBB) efficiently, a new gene encoding PTD-MAX was synthesized and cloned into the expression vector pKYB. The recombinant vector pKYB-PTD-MAX was transformed into *Escherichia coli* ER2566. The expression of fusion protein consisting of PTD-MAX, intein and chitin binding domain was induced by IPTG and the target PTD-MAX protein was purified using Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag system. The molecular weight of PTD-MAX determined by the laser flight mass spectrometry was coherent with its theoretical value. The results of the experiment *in vivo* indicated that the recombinant PTD-MAX can permeate into BBS and inhibitory effects on the food intake were more significantly than maxadilan ($P<0.05$). The preparation of PTD-MAX lay the foundation for its further application.

Keywords: PTD-MAX, maxadilan, intein, blood-brain barrier

maxadilan 是一种血管舒展肽, 最早在 1991 年 发现于白蛉的唾液腺提取物中^[1], 是由 61 个氨基酸

Received: July 18, 2009; **Accepted:** September 30, 2009

Supported by: Guangdong Provincial Nature Science Foundation of China (No. 06300579), Science Technology Research Key Project of the Educational Department of China (No. 207141), Young People Foundation of Jinan University (No. 51208018).

Corresponding author: Rongjie Yu. Tel: +86-20-85220220; Fax: +86-20-85221983; E-mail: rongjie_yu123@163.com

广东省自然科学基金项目(No. 06300579), 教育部科学技术研究重点项目(No. 207141), 暨南大学青年基金(No. 51208018)资助。

组成的多肽。maxadilan 可以用于松弛兔内皮组织的主动脉环并提升组织中的 cAMP, 表明 maxadilan 可以和平滑肌细胞表明受体相互作用^[2]。同时, maxadilan 可以结合不同物种的脑提取物, 并且可以结合神经血管衍生细胞系, 如鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 和人成神经细胞瘤系 NBE1^[3]。研究表明 MAX 是 PAC1 的特异性激动剂^[4-6]。PAC1 是 PACAP 的特异性受体, 主要分布于中枢神经系统、周围神经系统及肺、呼吸道等肺神经组织中^[7-8]。PAC1 介导多种生物学功能, 如神经损伤修复^[9], 调节血管^[10], 能量代谢平衡^[11]等。maxadilan 通过作用 PAC1 受体在神经干细胞增殖中起着重要的作用^[12]; 因此利用 maxadilan 做为 PAC1 的特异性激动剂能用于治疗中风、脑损伤和减轻 Raynaud 现象的血管收缩等相关脑部疾病^[6]。

PTD(Protein transduction domain)是最初发现于 HIV 病毒 TAT 蛋白中的一个结构域^[13-14]。TAT 蛋白全长 86 个氨基酸, 其中第 38~58 个氨基酸残基具有很强的穿膜功能, 不仅能够有效地引导与之相连的全长蛋白进入体外培养的细胞, 而且通过血液、腹腔等途径, 目的蛋白可以被导入动物全身各组织细胞内。进一步研究发现, 具有穿膜功能的核心区为 11 个氨基酸 YGRKKRRQRRR, 含有 8 个碱性氨基酸, 生理条件下带较高的正电荷, 并形成稳定的螺旋结构。PTD 具有强大的运载潜能, 不同来源、不同结构的 PTD 均有能力将外源性蛋白质、DNA、RNA、化学药物、磁珠、脂质体等转运至细胞内, 并且此过程不受化合物/复合物分子类型和大小的限制。

PTD 已被证实有效协助外源蛋白进入血脑屏障, 如 Liu 等^[15]将纯化的 PTD-BCR/ABL 融合蛋白经尾静脉注入小鼠体, 脑切片发现全脑组织细胞中均检测到 PTD-BCR/ABL 融合蛋白, 呈非特异性组织分布。Gong 等^[16]用 Tat 将泛素羧基末端水解酶 L1 (Ubiquitin C2term inal hydrolase L1, Uch2L1)转导入脑, 腹腔注射 Tat2Uch2L1 能明显改善 AD 转基因动物的学习记忆功能。本研究尝试构建 PTD 和 maxadilan 的融合蛋白 PTD-MAX, 利用 PTD 介导 maxadilan 高效通过血脑屏障, 从而有效进入脑部, 发挥生物学功能, 为新型重组蛋白在脑损伤、脑中风、老年痴呆等脑部疾病

的诊断和治疗中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株和质粒载体等

菌株 *E. coli* strain ER2566 和质粒 pKYB 均购自美国 New England Biolabs(NEB)公司, 菌株 DH5 α 为本实验室保存, 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.1.2 酶及其他试剂

限制酶 *Nde* I 和 *Xho* I 购自美国 New England Biolabs(NEB)公司, *Taq* 酶和 T4 连接酶购自大连 TaKaRa 公司; PCR Purification Kit、Gel Extraction Kit 和 Plasmid Miniprep Kit 购自 Qiangen 公司; IPTG 为 Promega 产品; 几丁质珠购自美国 NEB 公司; maxadilan 蛋白由实验室合成。

1.1.3 实验动物

SPF 级雄性 KM 小鼠购自广东省医学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 合成重组 PTD-MAX 基因

利用引物悬挂, 在 maxadilan 的 N 端引入 PTD 短肽 YGRKKRRQRRR, 由于重组表达需要, 在融合蛋白 N 端添加起始密码 ATG 编码的 Met; 为了保证 intein 的有效切割, 融合蛋白 C 端保留载体上的 5 个氨基酸 LEGSS, 因此新型融合蛋白由 78 个氨基酸组成。根据大肠杆菌密码偏好性, 设计 3 条引物, 在已有的 Maxadilan 基因基础上, 采用两步法合成 PTD-MAX 基因(图 1)。①PCR 反应: 引物 F2 (0.01 A/ μ L) 1 μ L, R1(0.01 A/ μ L) 1 μ L, MAX 质粒抽提液 1 μ L, dNTPs 10 μ L, 10 \times TaKaRa Ex Buffer 10 μ L, TaKaRa Ex *Taq* 酶 1 μ L, H₂O 76 μ L, 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; ②以第①步 PCR 反应产物为模板, 引物 F1 (0.01 A/ μ L) 1 μ L, R1(0.01 A/ μ L) 1 μ L, 延伸反应液 1 μ L, dNTPs 10 μ L, 10 \times TaKaRa Ex Buffer 10 μ L, TaKaRa Ex *Taq* 酶 1 μ L, H₂O 76 μ L, 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。合成重组 PTD-MAX 基因的 3 条引物为: F1(5-3): NNNNNN CAT ATG TAT GGC CGT AAA AAA CGT CGT CAG

CGT CGT; F2(5-3): AAA AAA CGT CGT CAG CGT CGT CGT TGC GAT GCG ACC TGC CAG TTT; R1: NNNNNN CTC GAG CGC TTT AAA TTC TTT TTT TTT CTG 其中, N 代表保护碱基, CAT ATG 为 *Nde* I 酶切位点, CTC GAG 为 *Xho* I 酶切位点。

1.2.2 表达质粒的构建与鉴定

用 *Nde* I 和 *Xho* I 分别对重组 PTD-MAX 基因和质粒 pKYB 进行双酶切, 将酶切后的重组 PTD-MAX 基因克隆到质粒 pKYB 的 *Nde* I 和 *Xho* I 位点间, 构建重组质粒 pKYB-PTD-MAX(图 2), 将重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 用 PCR 对重组子进行初步鉴定, 并通过基因测序鉴定正确的阳性克隆。

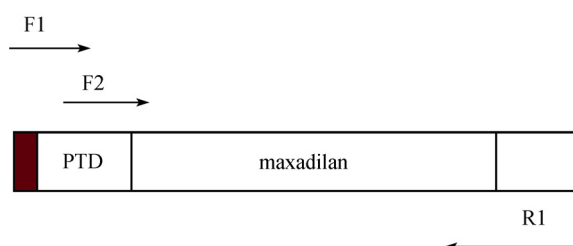


图 1 重组 PTD-MAX 的设计及合成示意图

Fig. 1 Strategy for syntheses of recombinant PTD-maxadilan gene.

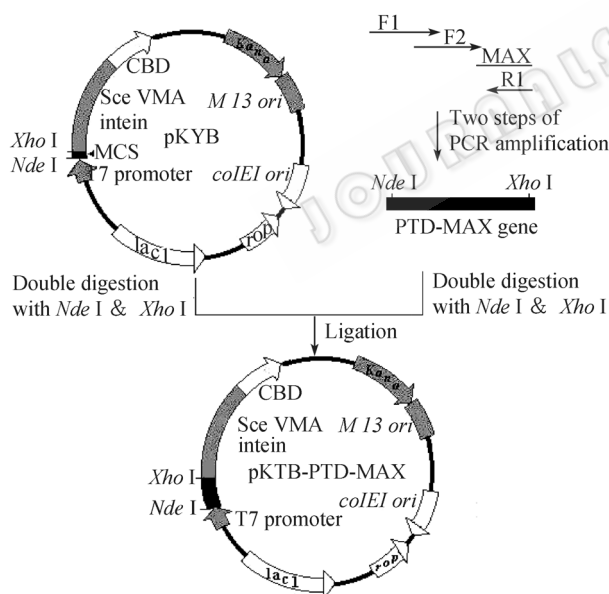


图 2 重组表达质粒 pKYB-PTD-MAX 的构建示意图

Fig. 2 Construction of expression plasmids pKYB-PTD-MAX.

1.2.3 融合蛋白的诱导表达

重组质粒 pKYB-PTD-MAX 转化表达宿主菌 *E. coli* Strain ER2566, 构建表达工程菌 pKYB-PTD-MAX-ER2566; 挑取单克隆于 10 mL 含 50 μ g/mL 卡

那霉素的 LB 培养基中, 摇瓶培养过夜, 以 1:50 接种于 500 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37°C 摇菌至 OD_{600} 为 0.4~0.6, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 30°C 诱导 3 h。离心收集菌体, 取 10 g 重悬于 100 mL 的溶液 A(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中, 然后超声破碎, 离心收集上清。

1.2.4 融合蛋白的诱导切割和纯化

以纯化 10 g 菌体为例: 取 10 mL 几丁质珠装填 2.5 cm \times 10 cm 层析柱, 不少于 10 倍体积的缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)洗柱; 以 0.5 mL/min 的速度加入破碎上清; 大于 10 倍体积的缓冲液 A 以 1 mL/min 的流速洗去杂蛋白, 30 mL 缓冲液 B(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0)快速过柱, 使 β -巯基乙醇均匀分布并浸泡柱内填料, 4°C 诱导内含肽切割 16 h。缓冲液 A 洗脱目的多肽, 分管收集, 每 1 mL 为一管, 目的多肽大多存在于 3~12 管中。4°C 透析过夜除去 β -巯基乙醇。

1.2.5 重组多肽 PTD-MAX 的鉴定

用 15%的 SDS-PAGE 对融合蛋白的表达和目的蛋白的纯度进行初步鉴定。将目的蛋白冻干后送北京军事医学科学院进行激光飞行质谱检测, 测定其分子量。

1.2.6 重组 PTD-MAX 穿血脑屏障的功能检测

利用 FITC(异硫氰酸荧光素)标记试剂盒, 对 PTD-MAX、maxadilan 进行荧光标记。KM 小鼠按体重随机分为 5 组, 分别腹腔注射: PTD-MAX-FITC 高剂量组, 1 nmol/kg; PTD-MAX-FITC 低剂量组, 0.1 nmol/kg; maxadilan-FITC 高剂量组, 1 nmol/kg; maxadilan-FITC 低剂量组, 0.1 nmol/kg; 0.9% NaCl (Saline)。注射后 6 h, 颈椎脱臼处死小鼠, 取小鼠的脑组织, 用 PBS 漂洗数次。以 150 mg 湿重脑组织/mL PBS 的比例分装至 EP 管中, 超声破碎 45 s, 4°C 下 16 000 \times g 离心 30 min, 取上清 200 μ L 加入 96 孔板中, 用荧光分光光度计, 激发光 495 nm, 检测各个样品在 520 nm 的发射强度。

1.2.7 重组 PTD-MAX 对 KM 小鼠摄食的影响

清洁级(SPF 级)KM 雄性小鼠, 体重(20 \pm 3) g,

按体重随机分组, 每组 8 只。一共分为 3 组, PTD-MAX 组、maxadilan 对照组和空白对照组。小鼠禁食 12 h 后, 50 nmol/kg 的重组蛋白腹腔注射 KM 小鼠, 注射生理盐水作为空白对照。观察注射后 5、10、24 h, 小鼠摄食量的变化。

2 结果

2.1 PCR 扩增 PTD-MAX 基因序列

按方法 1.2.1, 采用 PCR 扩增获得目的片段(图 3), 大小为 228 bp。

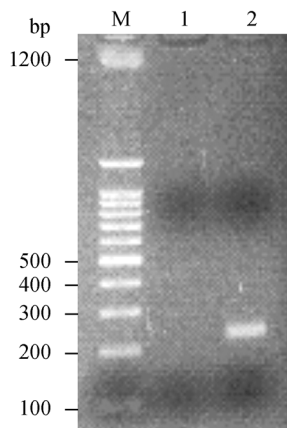


图 3 PTD-MAX 基因的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of recombinant PTD-MAX gene. M: DNA marker; 1: negative control; 2: PTD-MAX gene.

2.2 重组表达载体 pKYB-PTD-MAX 的鉴定

利用引物 F1 和 R1 对重组子通过 PCR 扩增进行初步鉴定(图 4), 再以 T7 启动子为测序引物: T7 universal Primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 进行测序鉴定, 所得序列结果与设计完全一致(图 5)。

2.3 工程菌的检测及目的多肽的纯化与鉴定

按方法 1.2.3 构建工程菌 pKYB-PTD-MAX-ER, 经过 IPTG 诱导后, 由重组 PTD-MAX、intein 和 CBD

组成的融合蛋白能够进行可溶表达(图 6, 泳道 2), 当破碎上清上样流过几丁质柱填料以后, 大部分融合蛋白能通过几丁质结合域与几丁质珠结合。用溶液 A 洗柱, 可将许多非特异性结合的杂蛋白洗脱下来, 而融合蛋白不会被洗脱下来。用 β -巯基乙醇在 4°C 切割 24 h 以后, 目的蛋白从融合蛋白上切割下来, 用溶液 A 过柱以后, 目的蛋白被洗脱下来(图 6, 泳道 7), 而 intein 和 CBD 仍结合在几丁质珠上(图 6, 泳道 6)。目的蛋白用生理盐水透析去掉 β -巯基乙醇以后, 用激光飞行质谱检测其分子量为: 9021.118(图 7), 这与理论值相符。

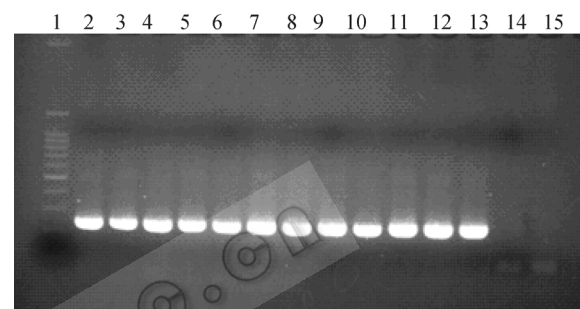


图 4 原核表达载体 pKYB-PTD-MAX 的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of prokaryotic expression vectors of pKYB-PTD-MAX. 1: DNA marker; 2-13: positive clones of pKYB-PTD-MAX; 14: blank control (H₂O); 15: negative control (pKYB).

2.4 重组多肽 PTD-MAX 的活性测定

2.4.1 重组 PTD-MAX 穿血脑屏障的功能检测

按实验方法 1.2.6 在小鼠分别腹腔注射 PTD-MAX-FITC, maxadilan-FITC 后, 处死小鼠, 取脑组织检测各个样品在 520 nm 的发射强度。以 Saline 组的荧光测定值为 1, 各组的荧光发光值与 Saline 组的比值为纵坐标作图, 结果如图 8 所示, PTD-MAX-FITC 低、高剂量组的荧光比值显著($P < 0.01$)高于 saline 组, 而 maxadilan-FITC 低、高剂量组的荧光比

1	AATTTTGT	AACTTAA	AGGAGAT	CATATGT	ATG GCCG	TAAAAA	ACGTCG	TCAG CG	TCGTCG	TT	70
71	GCGATG	CGAC CT	GCCAGT	TTT CGT	AAAGCG	ATTGAT	GATTG CC	AGAAAC	AG GCGA	TCATA G	140
141	GCAGAC	CAGC GT	GCAGAC	CA CCG	CGACCT	TACCAG	CATG GA	TACCAG	CC AGCT	GCCGGG	210
211	TTTAAAG	AAT GC	ATGAAAC	A GAAAA	AAAAAA	GAATTT	AAAG CG	CTCGAG	GG CTCT	CCTGC T	280
281	GTACCA	ATGT TT	AATGGCG	GATGGG	TCTA TT	GAATGT	AT TGA	AAACAT	T GAGG	TTGGTA	350
351	GGGTAA	AGAT GC	CAGACCT	C GTAG	GTAAT	TAAATT	GCCC AG	AGGAAG	AG AA	ACTATGT	420

图 5 重组表达质粒 pKYB-PTD-MAX 的测序鉴定

Fig. 5 Sequencing result of pKYB-PTD-MAX using T7 promoter as sequencing primer.

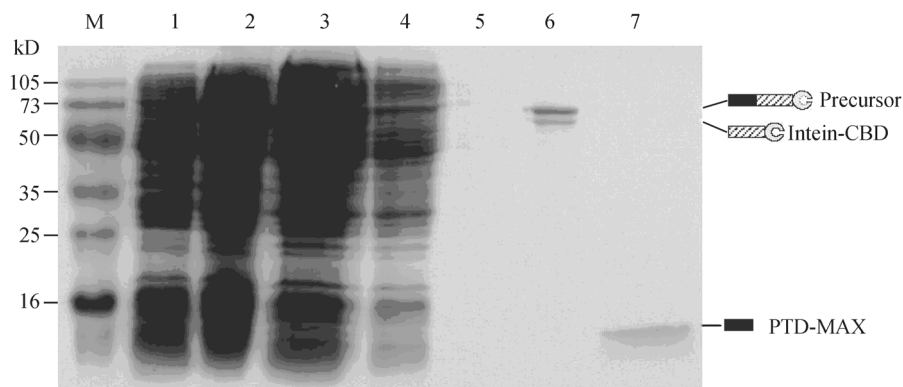


图 6 PTD-MAX 蛋白表达与纯化 15% SDS-PAGE 电泳图

Fig. 6 SDS-PAGE(15%) analysis of expression and purification of PTD-MAX. M: protein marker; 1: uninduced bacteria; 2: induced bacteria; 3: supernatant of ultrasonicated bacteria; 4: chitin column flow through; 5: chitin column wash; 6: SDS stripping of remaining proteins bound to chitin column; 7: recombinant PTD-MAX after self-cleavage reaction.

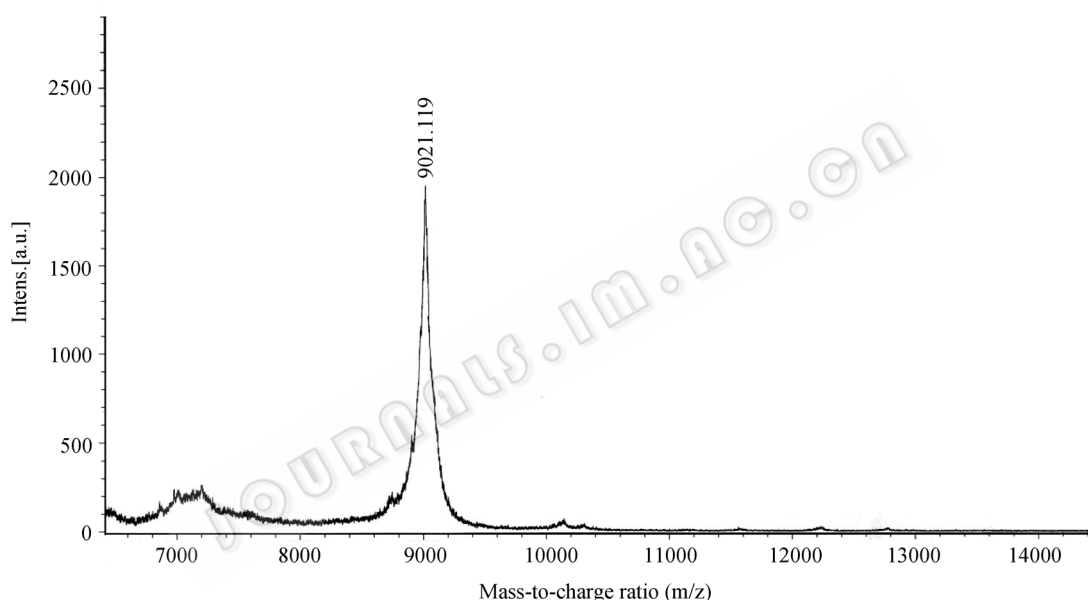


图 7 重组 PTD-MAX 的激光飞行质谱鉴定图

Fig. 7 Laser Flight Mass spectrometry of recombinant PTD-MAX.

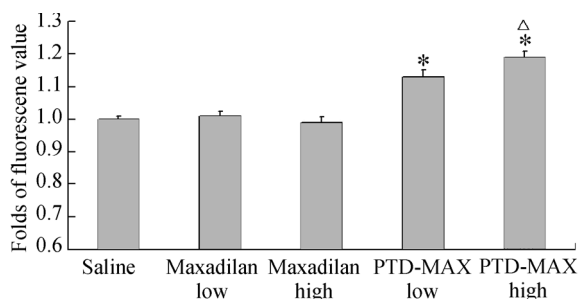


图 8 PTD-MAX 穿越血脑屏障的活性测定

Fig. 8 Activity assay of permeating into BBB by PTD-MAX.

*: $P < 0.01$, vs. saline; Δ : $P < 0.01$, vs. PTD-MAX low.

值与 saline 组相比, 没有明显的差异。而且 PTD-MAX-FITC 高剂量组荧光比值又显著比 PTD-MAX-ITC 低剂量组高($P < 0.01$), 这说明 PTD-MAX 能有效穿越血脑屏障, 进入脑组织, 而且 PTD-MAX-FITC 浓度越高, 进入脑组织的就越多。

2.4.2 重组 PTD-MAX 对 KM 小鼠摄食的影响

按照实验方法 1.2.7 中的方法, 在小鼠注射重组 PTD-MAX、Maxadilan 和生理盐水后, 观测注射后小鼠 5、10、24 h 的摄食情况(图 9), PTD-MAX 与 maxadilan 有显著的抑制小鼠摄食的作用, 且注射

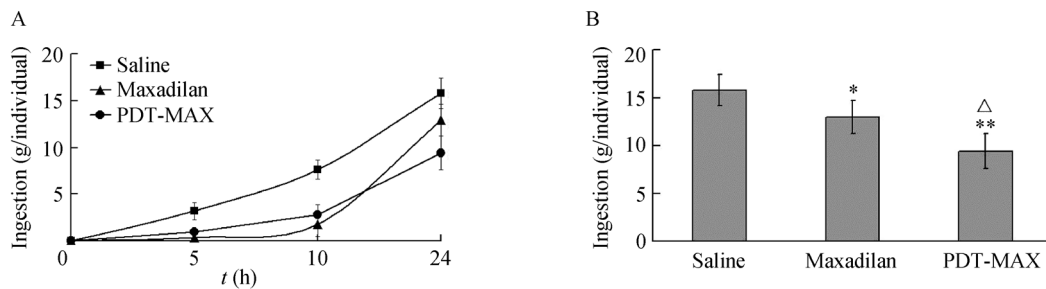


图9 重组 PTD-MAX 对 KM 小鼠摄食的影响

Fig. 9 Effects of PTD-MAX and maxadilan on food intake in KM mice. (A) Food intake prior to 0, 5, 10, 24 h after intraperitoneal injection of saline alone (0.9%, W/V, NaCl) or in combination with 50 nmol/kg maxadilan or 50 nmol/kg PTD-MAX. (B) Comparison with food intake in 24 hour after intraperitoneal injection of saline alone (0.9%, W/V, NaCl) or in combination with 50 nmol/kg maxadilan or 50 nmol/kg PTD-MAX. *: $P < 0.05$, vs. saline; **: $P < 0.01$, vs. saline; Δ : $P < 0.05$, vs. maxadilan.

24 h 后 PTD-MAX 对小鼠摄食抑制的作用显著比 maxadilan 强 ($P < 0.05$); 这显示 PTD-MAX 具有比 maxadilan 更长效的显著的抑制摄食的作用。

3 讨论

本实验成功地利用了 IMPACT(Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)纯化系统, 通过目的蛋白与蛋白自剪接元件 intein、几丁质结合蛋白域(CBD)形成融合蛋白, 经过几丁质柱亲和和层析纯化融合蛋白。在特定的条件下, 诱导内含肽的自我剪切, 将目的蛋白释放, 而内含肽与 CBD 仍然结合在几丁质柱上, 从而达到分离纯化效果。经纯化 10 g 菌体可以获得 4.2 mg 的 PTD-MAX 蛋白(表 1)。经 SDS-PAGE 检测纯度可以达到 90% 以上, 从而实现了 PTD-MAX 的高效制备。

PACAP 是一种涉及葡萄糖和能量代谢稳态的神经内分泌激素^[17], Mizuno 等^[18]发现脑室注射 PACAP 可以使小鼠大脑产生厌食的信号从而使小鼠的摄食量降低。Manruiyama 等^[19]向金鱼 3V 注入 20 pmol/(L·g BW)的 PACAP38, 发现在注射后 2 h, 金鱼采食量显著下降, 同时促肾上腺皮质激素释放激素(CRH) mRNA 表达显著高于对照组。大量的实验

表明, PACAP 抑制摄食是通过两种途径造成的: 一是瞬时抑制摄食途径, 即 PACAP 直接作用外周组织, 通过促进糖原分解, 提高血糖浓度, 从而达到瞬时的抑制摄食^[20]。二是长期抑制摄食途径, PACAP 在脑组织参与了下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的功能性调节, PACAP 可能直接作用于室旁核(PVN)的 CRH(CRF)神经元, 引起 CRH(CRF)神经元兴奋, 促进垂体促肾上腺皮质激素的释放, 使动物的食欲受到抑制, 从而实现长效抑制动物摄食的作用^[20]。

本实验中的 maxadilan 和 PTD-MAX 作为 PAC1 的特异激动剂, 可以有效降低小鼠的摄食量, 这与已有报道^[21]相符。PTD-MAX 穿越血脑屏障实验表明 PTD-MAX 能有效穿越血脑屏障, 进入脑组织 PTD-MAX。因此在 5~10 h 的抑制摄食作用不如 maxadilan, 是因为结合了蛋白转导结构域的 PTD-MAX, 提高了其穿过血脑屏障的能力, 降低了 maxadilan 在外周组织中的作用浓度, 从而使 PTD-MAX 的瞬时抑制摄食作用比 maxadilan 弱。但在 24 h 后, PTD-MAX 的抑制摄食作用比 maxadilan 显著增强 ($P < 0.05$), 是因为结合了蛋白转导结构域的 PTD-MAX, 提高了其穿过血脑屏障的能力从而提高了其在脑组织中的作用浓度, 通过作用下丘脑,

表 1 1 L 培养基中重组 PTD-MAX 的纯化效率和回收率

Table 1 Purification and recovery of recombinant PTD-MAX from 1 L culture

Purification step	Total protein (mg)	Target protein (mg)	Purity (%)	Recovery (%)
Total bacterial production	1000	264(PTD-MAX-intein-CBD)	26.4	100.0
Supernant of ultrasonicated bacteria	600	100.8(PTD-MAX-intein-CBD)	16.8	38.2
Chitin column and intein-mediated cleavage	4.2	4.0(recombinantPTD-Maxadilan)	90	1.5

调控下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA) 的功能, 刺激一系列的下游激素的释放, 造成长效、显著的抑制摄食的效果。

本研究利用基因工程技术, 构建重组 PTD-MAX, 结合 IMPACT 系统实现重组 PTD-MAX 的制备, 利用 PTD 强大的跨膜转导能力, 探索和尝试提高 maxadilan 的穿血脑屏障的能力, 为药物的开发奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, *et al.* Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem*, 1991, **266** (17): 11234–11236.
- [2] Moro O, Tsomides TJ, Tajima M, *et al.* Maxadilan binds to membrane fractions of brain tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **216**(November (1)): 234–241.
- [3] Moro O, Tajima M, Lerner EA. Receptors for the vasodilator maxadilan are expressed on selected neural crest and smooth muscle-derived cells. *Insect Biochem Mol Biol*, 1996, **26** (10): 1019–1025.
- [4] Moro O, Lerner EA. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem*, 1997, **272**(2): 966–970.
- [5] Pereira P, Reddy VB, Kounga K, *et al.* Maxadilan activates PAC1 receptors expressed in *Xenopus laevis* melanophores. *Pigment Cell Res*, 2002, **15**(6): 461–466.
- [6] Lerner EA, Iuga AO, Reddy VB. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides*, 2007, **28**(6): 1651–1654.
- [7] Shioda S, Shuto Y, Somogyvári-Vigh A, *et al.* Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat brain. *Neurosci Res*, 1997, **28** (4): 345–354.
- [8] Wei Y, Mojsov S. Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactiveintestinal polypeptide: implications for their role in human physiology. *J Neuroendocrinol*, 1996, **8** (11): 811–817.
- [9] Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, *et al.* Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, **153**(1/3): 115–123.
- [10] Chang Q, Deng YP, Liu SH. Morphologic study on PACAP protecting vascular smooth muscle cell from damage by LDL PACAP. *Prog Anatom Sci*, 1999, **5**(4): 347–349.
- [11] Jarry H, Leonhardt S, Schmidt WE, *et al.* Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on *in vivo* and *in vitro* prolactin and growth hormone release in male rats. *Life Sci*, 1992, **51**(11): 823–830.
- [12] Mercer A, Ronnholm H, Holmberg J, *et al.* PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res*, 2004; **76**(April (2)): 205–215.
- [13] Green M, Loewenstein PM. Autonomors functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat transactivator protein. *Cell*, 1988, **55**(6): 1179.
- [14] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, **55**(6): 1189.
- [15] Liu Q, Liang YM, Zheng J, *et al.* Delivery of macromolecular protein across blood-brain into brain and its distribution in brain mediated by PTD. *China J Mod Med*, 2003, **13**(5): 33–35.
刘强, 梁英民, 郑瑾, 等. PTD 介导蛋白通过血脑屏障及其在脑组织中的分布. 中国现代医学杂志, 2003, **13**(5): 33–35.
- [16] Gong B, Cao Z, Zheng P, *et al.* Ubiquitin hydrolase Uch2L1 rescues beta-amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. *Cell*, 2006, **126**(4): 775–788.
- [17] Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, *et al.* Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev*, 1998, **50**(6): 265–270.
- [18] Mizuno Y, Kondo K, Terashima Y, *et al.* Anorectic effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rats: lack of evidence for involvement of hypothalamic neuropeptide gene expression. *Neuroendocrinol*, 1998, **10**: 611–616.
- [19] Manruyama K, Miura T, Uchiyama M, *et al.* Relationship between anorexigenic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and that of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the goldfish. *Peptides*, 2006, **27**(7): 1820–1826.
- [20] Yue SM, Wang ZS, Zhou AG, *et al.* Effect of PACAP on animal feed intake and feeding behaviors. *Chin J Anim Sci*, 2008, **44**(13): 52–56.
岳双明, 王之盛, 周安国, 等. PACAP 对动物采食量和摄食行为的影响. 中国畜牧杂志, 2008, **44**(13): 52–56.
- [21] Yu RJ, Yi TH, Xie SS, *et al.* Long-term administration of maxadilan improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice. *Peptides*, 2008, **29**(3): 1347–1353.