

TAT-FGF21 融合蛋白的构建表达纯化及神经保护活性

陈苏婷, 陈松, 高向东*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 210009)

摘要 为了提高成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 的脑内分布而设计 TAT-FGF21 融合蛋白并探讨其神经保护活性。通过构建 pET28a-TAT-FGF21 重组质粒, 并转化至 *E. coli* BL-21 (DE3) 感受态细菌, 经异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达后通过镍离子金属螯合亲和层析介质 (Ni-NTA) 亲和色谱柱分离纯化获得 TAT-FGF21 融合蛋白。随后利用 A β_{25-35} 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤模型, 并以 TAT-FGF21 融合蛋白进行干预。MTT 法检测 TAT-FGF21 对 A β_{25-35} 致 SH-SY5Y 细胞活性下降的干预作用; DCFH-DA 荧光探针法检测 TAT-FGF21 对 A β_{25-35} 致 SH-SY5Y 细胞内活性氧生成增加的干预作用; JC-1 荧光探针法检测 TAT-FGF21 对 A β_{25-35} 致 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位异常下降的干预作用。结果显示, TAT-FGF21 能够提高 SH-SY5Y 细胞活性、降低 SH-SY5Y 细胞内 ROS 生成水平、提高 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位, 提示 TAT-FGF21 可以通过缓解氧化损伤发挥神经保护作用。

关键词 TAT-FGF21; 表达; 纯化; 神经保护活性; 活性氧; 线粒体膜电位

中图分类号 Q786 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)04-0496-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20180417

引用本文 陈苏婷, 陈松, 高向东. TAT-FGF21 融合蛋白的构建表达纯化及神经保护活性[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 496–501.
Cite this article as: CHEN Suting, CHEN Song, GAO Xiangdong. Construction, expression, purification and neuroprotective activity of TAT-FGF21 fusion protein[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(4): 496–501.

Construction, expression, purification and neuroprotective activity of TAT-FGF21 fusion protein

CHEN Suting, CHEN Song, GAO Xiangdong*

Jiangsu Key Laboratory of Biopharmaceutical Research, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In order to improve the brain distribution of fibroblast growth factor 21 (FGF21), TAT-FGF21 fusion protein was designed and its neuroprotective activity was investigated. The recombinant plasmid of pET28a-TAT-FGF21 was constructed and transformed into *E. coli* BL-21 (DE3) sensitive bacteria. The TAT-FGF21 fusion protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography column after IPTG induced expression. The SH-SY5Y cell damage model was induced by A β_{25-35} , and the TAT-FGF21 fusion protein was used to intervene. The effects of A β_{25-35} and TAT-FGF21 induced on SH-SY5Y cell viability were determined using MTT method; DCFH-DA fluorescent probe was used to detect the intervention effect TAT-FGF21 on reactive oxygen species (ROS) generation induced by A β_{25-35} in SH-SY5Y cells; the effects of A β_{25-35} and TAT-FGF21 on mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells were detected with JC-1 fluorescent probe. The results showed that TAT-FGF21 could improve the viability of SH-SY5Y cells, reduce the intracellular ROS production level of SH-SY5Y cells, and enhance the mitochondrial membrane potential of SH-SY5Y cells, which indicate that TAT-FGF21 could protect neurons on SH-SY5Y cell injury induced by A β_{25-35} through alleviating oxidative damage.

Key words TAT-FGF21; expression; purification; neuroprotective activity; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential

收稿日期 2018-05-24 *** 通信作者** Tel: 025-83271543 E-mail: xdgao@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673435, No. 81473216)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81673435, No. 81473216)

成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21)是由 FGF 基因家族编码的一种蛋白质,主要在肝脏、胰腺及脂肪组织中表达^[1]。一直以来,以 FGF21 为代表的 FGF 亚家族成员都是糖脂代谢研究的热点^[2]。近年来,FGF21 在中枢神经系统中发挥的生物学作用逐渐受到人们的关注^[3]。研究显示,FGF21 及其受体在脑内广泛表达,为 FGF21 在神经系统中发挥作用提供了可能^[4]。

作为一种中枢神经系统疾病治疗药物,提高脑内分布是发挥药效的一个重要前提。虽然 FGF21 可以通过简单扩散的方式进入血-脑脊液屏障,但速率较低,仅为白蛋白的 4 倍^[5]。细胞穿透肽 (cell penetrating peptides, CPPs) 常常作为递药载体,将药物输送至细胞内,甚至是血-脑脊液屏障内^[6]。对于那些本身能够进入血-脑脊液屏障的分子(如胰岛素、GLP-1、exendin-4 等),利用 CPPs 作为递药载体,除了能增加目的分子穿过血-脑脊液屏障的速率,还可以增加其进入细胞的能力及其在某些器官、组织中的吸收及分布^[7]。目前已有文献报道,CPPs 可以引导蛋白质药物治疗中枢神经系统疾病^[8]。细胞穿透肽 TAT 是最常用的 CPPs 之一,富含碱性氨基酸,可以携带核酸、多肽、蛋白、脂质体、纳米颗粒等分子进入细胞,且具有较低的细胞毒性^[9-10]。这种穿膜方式不依赖经典的胞吞作用,不需要受体介导,不消耗能量,而是依赖于 TAT 所带正电荷与细胞膜之间的静电作用^[11]。TAT 与蛋白药物连接后,可以介导大分子进入脑内从而发挥神经保护作用。例如,Yin 等^[12]发现,静脉注射 TAT-Bcl-xL 能明显抑制由脑缺血引起的神经细胞凋亡及坏死。作为一种有效的转运工具,TAT 在药物转运、基因转染及细胞融合等方面具有广阔的发展前景^[13]。

本实验通过构建含 pET28a-TAT-FGF21 的工程菌,经诱导表达和 Ni-NTA 亲和色谱柱分离纯化得到 TAT-FGF21 融合蛋白。随后建立 A β_{25-35} 致 SH-SY5Y 细胞损伤模型^[14],考察该模型下 TAT-FGF21 对细胞活性、ROS 生成水平、线粒体膜电位的影响,从细胞水平上初步验证 TAT-FGF21 的神经保护活性。

1 材料

1.1 试剂

pET28a-TAT-FGF21 质粒(中国苏州金唯智生物科技有限公司);Ni-NTA 纯化介质、质粒测序(中国金斯瑞生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(中国碧云天生物技术研究所);蛋白标准 Marker(美国 Thermo 公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);卡那霉素、胰蛋白酶、MTT(中国 Biosharp 公司);A β_{25-35} [中国吉尔生化(上海)有限公司];其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);细胞培养箱、高速冷冻离心机、全波长酶标仪(美国 Thermo 公司);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 菌株与细胞

E. coli BL-21(DE3)、神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株购自美国菌种保藏中心(ATCC)。

2 方法

2.1 TAT-FGF21 表达菌株的构建

将 His 标签(HHHHHH)与细胞穿透肽 TAT(YGRKKRRQRRR)添加到 FGF21 的 N 端,构建 pET28a-TAT-FGF21 重组质粒,转化至 *E. coli* BL-21(DE3)感受态细菌,接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上,37 °C 培养 14 h,挑取阳性单克隆,于 LB 液体培养基中扩大培养,制成甘油菌保存并测序。

2.2 TAT-FGF21 融合蛋白的表达

TAT-FGF21 的重组菌经测序鉴定正确后,取甘油菌 200 μ L 接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基 20 mL 中,37 °C、220 r/min 培养过夜。取过夜培养物 2 mL 接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基 200 mL 中,37 °C、220 r/min 培养。待 A₆₀₀ 达 0.6 ~ 0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导蛋白表达,37 °C、220 r/min 培养 5 h,8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。以洗涤缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)洗涤菌体 1 次,

称量湿菌重。

2.3 TAT-FGF21 融合蛋白的纯化

TAT-FGF21 融合蛋白在 37 °C 下以包涵体形式表达。按 10 mL/g 湿菌加入破菌缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)重悬菌体。功率 50%, 超声 3 s, 间隔 5 s, 冰浴超声 30 min。超声破碎后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。沉淀(含包涵体)用洗涤缓冲液洗涤 1 次, 之后用梯度缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 2 mol/L 尿素, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0)洗涤 2 次。沉淀称重, 按 10 mL/g 加入变性液(20 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0), 4 °C 搅拌过夜。将变性液 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集上清液, 并量取体积, 使用 Ni-NTA 亲和色谱柱进行纯化。过柱时预先用平衡液(20 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0)平衡, 随后上样, 上样结束后以平衡液充分平衡色谱柱, 以洗杂缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)去除杂蛋白, 以洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱目的蛋白, 收集洗脱组分。SDS-PAGE 电泳检测洗脱组分, 将目的蛋白含量高的组分在 4 °C 搅拌下缓慢滴加至 10 倍体积的复性缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L GSSG, 1 mmol/L GSH, 1 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素, pH 8.0)中, 滴加完毕后继续搅拌 2 h。复性完成后, 将复性的蛋白溶液 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 除去不溶物, 上清液透析至 PBS 中。经超滤浓缩后, SDS-PAGE 电泳检测纯化的目的蛋白, 并利用 BCA 法测定蛋白浓度。

2.4 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体的制备

准确称取 $A\beta_{25-35}$ 10 mg, 加入双蒸水 10 mL, 充分溶解; 在超净台中使用孔径为 0.22 μ m 的微孔滤器过滤除菌, 置于 37 °C 培养箱中进行寡聚化。4 d 后从培养箱中取出, 取少量用于 BCA 法测定蛋白浓度, 其余 -20 °C 保存待用。

2.5 细胞培养

SH-SY5Y 细胞于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在含 5% CO_2 的细胞培养箱中 37 °C 培养, 根据生长情况, 2~3 d 传代 1 次。

2.6 MTT 法检测 TAT-FGF21 对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤的干预作用

收集生长状态良好的 SH-SY5Y 细胞, 以每毫升 5×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 在含 5% CO_2 的细胞培养箱中 37 °C 培养过夜。选择 0.125 μ mol/L $A\beta_{25-35}$ 作为造模使用浓度, 损伤 SH-SY5Y 细胞 8 h 后, 给药组加入浓度为 1 μ mol/L 的 TAT-FGF21 进行干预, 共孵育 48 h 后 MTT 法检测各实验组细胞活性。同时设置空白组, 每组设置 6 个复孔。具体步骤为: 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 孵育 4 h, 吸去各孔中的培养基, 分别加入 DMSO 150 μ L, 置于摇床上振荡 10 min 使结晶物溶解完全, 使用酶标仪测定各孔的吸收度(以 570 nm 为检测波长, 630 nm 为参比波长)。

2.7 DCFH-DA 探针法检测 $A\beta_{25-35}$ 及 TAT-FGF21 对 SH-SY5Y 细胞内 ROS 生成水平的影响

收集生长状态良好的 SH-SY5Y 细胞, 以每毫升 5×10^4 个细胞的密度接种于 6 孔板, 每孔 1 mL, 在含 5% CO_2 的细胞培养箱中 37 °C 培养过夜。选择 0.125 μ mol/L $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞 8 h 后, 给药组加入浓度为 1 μ mol/L 的 TAT-FGF21 进行干预。共孵育 48 h 后, DCFH-DA 探针法检测各实验组 SH-SY5Y 细胞内 ROS 水平。具体步骤为: 用不含血清的 RPMI 1640 培养基将 DCFH-DA (10 mmol/L) 探针按 1:1 000 比例稀释, 使终浓度为 10 μ mol/L; 吸弃 6 孔板中旧培养基, 每孔加入无血清培养基 1 mL, 润洗 1 次; 吸弃培养基, 每孔加入稀释好的 DCFH-DA 溶液 1 mL, 37 °C 孵育 20 min; 吸弃 DCFH-DA 溶液, 每孔加入无血清培养基洗涤细胞 1 mL, 重复 3 次, 以充分去除游离的 DCFH-DA; 荧光显微镜下观察拍照。

2.8 JC-1 探针法检测 $A\beta_{25-35}$ 及 FGF21 对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

细胞铺板及干预具体实验方法同“2.7”项。共孵育 48 h 后, JC-1 荧光探针法检测各实验组 SH-SY5Y 细胞的线粒体膜电位。具体步骤为: 取 JC-1 (200 \times) 探针 50 μ L, 加入超纯水 8 mL, 充分溶解后再加入 JC-1 染色缓冲液(5 \times) 2 mL, 混合均匀, 配制成 JC-1 染色工作液; 吸弃 6 孔板中旧培养基, 每孔加入 PBS 1 mL, 润洗 1 次, 每孔再加入无血清培养基 1 mL; 每孔加入 JC-1 染色工作液 1 mL, 37 °C 孵育 20 min; 吸弃 JC-1 染色工作液, 每

孔加入 1 × JC-1 染色缓冲液洗涤细胞,重复 2 次,以充分去除游离的 JC-1;每孔加入无血清培养基 2 mL,荧光显微镜下观察拍照。

2.9 统计学分析

实验结果采用 GraphPad 统计软件进行处理,各项指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对两组样本采用 Student's *t*-test 进行显著性比较, $P < 0.05$ 时表明差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 TAT-FGF21 融合蛋白的构建

将构建的 pET28a-TAT-FGF21 重组质粒转化至 *E. coli* BL-21(DE3),通过抗生素筛选获得阳性菌落,经 *Eco* RV、*Nde* I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳出现大小约为 4 600 及 1 400 bp 的两条条带(图 1),表明质粒大小基本正确。经测序,结果与预期设计的序列完全一致,表明成功构建了含 pET28a-TAT-FGF21 的 *E. coli* BL-21(DE3)工程菌。

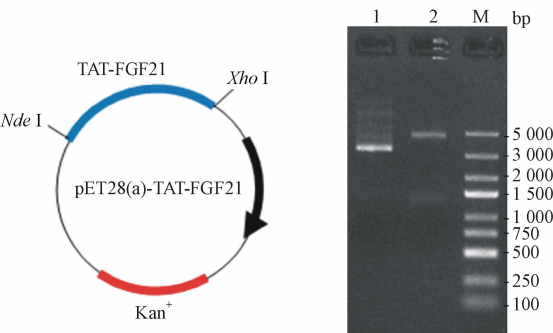


Figure 1 Identification of pET28a-TAT-FGF21 construction
Lane M: Nucleic acid marker; Lane 1: Undigested pET28a-TAT-FGF21;
Lane 2: pET28a-TAT-FGF21 digested with *Eco* RV and *Nde* I

3.2 TAT-FGF21 融合蛋白的表达

利用 IPTG 诱导 TAT-FGF21 融合蛋白表达, SDS-PAGE 电泳检测结果(图 2)显示,随着诱导时间的增加,目的蛋白逐渐表达,在诱导 5 h 后表达量达到最大值,约为总蛋白的 30%,主要以包涵体形式表达。TAT-FGF21 蛋白在 SDS-PAGE 电泳图中表现出高于其理论相对分子质量的性质,约为 28 kD(理论相对分子质量为 22.4 kD)。

3.3 TAT-FGF21 融合蛋白的纯化

蛋白经 Ni-NTA 亲和和色谱柱纯化后,采用 SDS-PAGE 进行鉴定,结果(图 3)显示,纯化后的蛋白相对分子质量约 28 kD,呈单一条带,纯度约为 92%。

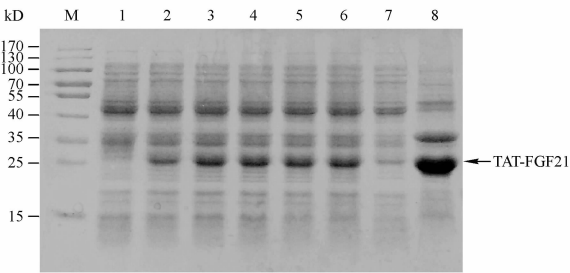


Figure 2 SDS-PAGE analysis of TAT-FGF21 expression
Lane M: Protein marker; Lane 1: Pro-induced; Lane 2-6: after-induced for 1, 3, 5, 7, 9 h; Lane 7: Supernatant after ultrasonic breakage; Lane 8: Precipitation after ultrasonic breakage

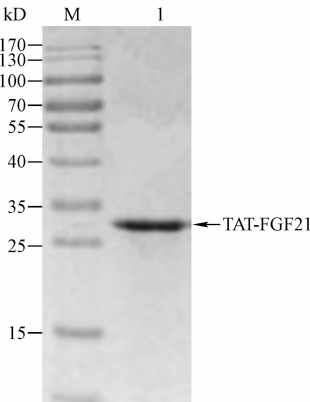


Figure 3 SDS-PAGE analysis of TAT-FGF21 purification
Lane M: Protein marker; Lane 1: TAT-FGF21

3.4 TAT-FGF21 对 Aβ₂₅₋₃₅ 致 SH-SY5Y 细胞损伤的干预作用

选择 0.125 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 作为损伤浓度,损伤 8 h 后,加入 1 μmol/L TAT-FGF21 共孵育 48 h, MTT 法检测细胞活性。结果(图 4)显示,Aβ₂₅₋₃₅ 组 SH-SY5Y 细胞活性显著下降,约为空白组的 40%,以 1 μmol/L TAT-FGF21 进行干预后 SH-SY5Y 细胞活力约提高 10%,说明 TAT-FGF21 对 Aβ₂₅₋₃₅ 引起的 SH-SY5Y 细胞损伤有一定程度的改善作用。

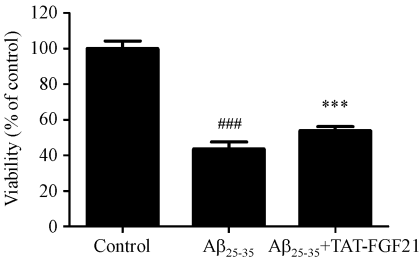


Figure 4 Neuroprotective effect of TAT-FGF21 against Aβ₂₅₋₃₅-induced toxicity on SH-SY5Y cell. Exposure to 0.125 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ and 1 μmol/L of FGF21 for 48 h, cell viability was increased compared with TAT-FGF21 untreated group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs Aβ₂₅₋₃₅ group

3.5 TAT-FGF21 对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞内 ROS 生成增加的干预作用

采用 DCFH-DA 荧光探针法检测不同干预条件下 SH-SY5Y 细胞内 ROS 水平。结果(图 5)显示,与空白组相比,模型组出现较强的绿色荧光,说明 $A\beta_{25-35}$ 能够引起 SH-SY5Y 细胞内 ROS 显著升高;而给药组与模型组相比,荧光强度明显减弱,表明 TAT-FGF21 能够降低 $A\beta_{25-35}$ 引起的 SH-SY5Y 细胞内升高的 ROS 水平。

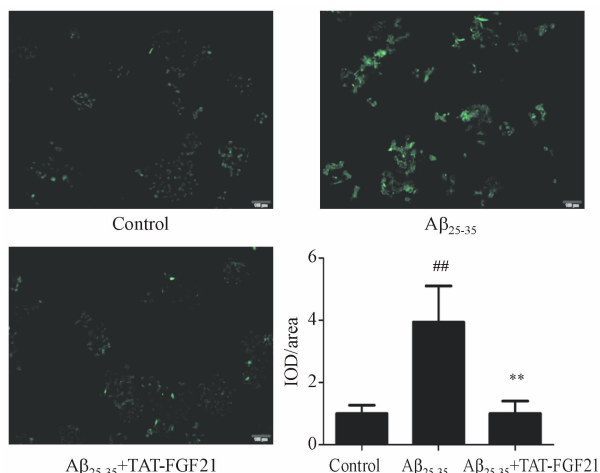


Figure 5 TAT-FGF21 prevents $A\beta_{25-35}$ -induced ROS damage in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were exposed to DCFH-DA analyzing ROS generation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

$P < 0.01$ vs control group; * * $P < 0.01$ vs $A\beta_{25-35}$ group

3.6 TAT-FGF21 对 $A\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞内线粒体膜电位下降的干预作用

JC-1 荧光探针法检测不同干预条件下 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位水平。结果(图 6)显示,与空白组相比,模型组 JC-1 探针单体较多,出现较强的绿色荧光,说明 $A\beta_{25-35}$ 引起 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位降低,细胞出现早期凋亡;给药组 JC-1 探针多形成聚合物,存在于线粒体基质中,出现较强的红色荧光,说明给药组线粒体膜电位趋于正常。结果表明,TAT-FGF21 能够调节 $A\beta_{25-35}$ 引起的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位降低水平。

4 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer disease's, AD)是神经退行性疾病中的一种常见类型,以认知障碍为主要临床表现^[15]。AD 在成人死亡原因之中排第 6 位^[16],给患者、患者家属以及整个社会带来了巨大的经济压力与精神负担。然而,AD 的预防手段和

治疗药物十分有限。迄今为止,FDA 与 SFDA 仅批准了 6 种 AD 治疗药物,即他克林、多奈哌齐、卡巴拉汀、加兰他敏、美金刚和石杉碱甲^[17]。然而,这些药物也只能通过干预治疗在一定程度上缓解 AD 的相关症状,在临床应用中常常呈现出不同

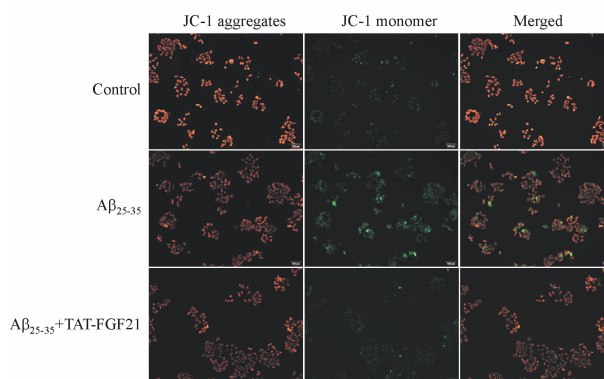


Figure 6 Effects of TAT-FGF21 on $A\beta_{25-35}$ -induced mitochondrial damage in SH-SY5Y cells. Mitochondrial membrane potential of different cell groups was viewed by JC-1 staining and confocal laser scanning microscope. The healthy mitochondria exhibited the red fluorescence staining characteristic of JC-1 aggregation while abnormal mitochondria exhibited the green fluorescence staining characteristic of JC-1 monomer ($n=3$)

程度的不良反应^[18]。近期研究显示,FGF21 可以改善肥胖胰岛素抵抗雄性大鼠的突触可塑性、树突状棘密度、脑线粒体功能和细胞凋亡,从而提高肥胖大鼠的认知功能^[19],提示 FGF21 可能具有防治 AD 等神经退行性疾病的潜力。为了增加 FGF21 穿过血-脑脊液屏障的速率、提高 FGF21 的脑内分布、增加 FGF21 防治 AD 等神经退行性疾病药物的可行性,本研究构建了 TAT-FGF21 原核表达菌株,经诱导表达、分离纯化获得了 TAT-FGF21 融合蛋白。

目前,AD 的发病机制尚无定论。“ β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $A\beta$)级联假说”认为 $A\beta$ 聚集是 AD 发生过程中的重要环节, $A\beta$ 的寡聚化与沉积对神经细胞具有异常毒性,可造成突触损伤、神经纤维缠结、神经元死亡,从而引起 AD 的发生^[20]。 $A\beta$ 是目前最常用于建立 AD 模型的物质之一。研究表明, $A\beta$ 对神经的损伤作用与氧化应激密切相关, $A\beta$ 可以进入线粒体,阻碍能量代谢过程,诱导大量 ROS 的生成,损伤线粒体的结构与功能,引起线粒体膜电位下降,最终导致神经细胞凋亡^[21]。因此,为了进一步探讨 TAT-FGF21 的神经保护作用,本研究利用寡聚化的 $A\beta_{25-35}$ 与 SH-

SY5Y 细胞共孵育建立神经细胞损伤模型,并以 TAT-FGF21 进行干预,考察了 TAT-FGF21 对 A β_{25-35} 致 SH-SY5Y 细胞活性下降、ROS 生成增加、线粒体膜电位异常下降的干预作用。实验结果表明,TAT-FGF21 融合蛋白可以通过缓解氧化损伤发挥神经保护作用,为 AD 等神经退行性疾病药物的开发提供了新的思路。

参考文献

- [1] Kharitonov A, Adams AC. Inventing new medicines: the FGF21 story[J]. *Mol Metab*, 2014, **3**(3): 221 – 229.
- [2] Degirolamo C, Sabba C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23 [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, **15**(1): 51 – 69.
- [3] Bookout AL, De Groot MH, Owen BM, et al. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system[J]. *Nat Med*, 2013, **19**(9): 1147 – 1152.
- [4] Sa-Nguanmoo P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Potential roles of fibroblast growth factor 21 in the brain[J]. *Metab Brain Dis*, 2016, **31**(2): 239 – 248.
- [5] Hsueh H, Pan W, Kastin AJ. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood[J]. *Peptides*, 2007, **28**(12): 2382 – 2386.
- [6] Kristensen M, Birch D, Nielsen HM. Applications and challenges for use of cell-penetrating peptides as delivery vectors for peptide and protein cargos[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, **17**(2): 185.
- [7] El-S K, Morishita M, Kamei N, et al. Efficiency of cell-penetrating peptides on the nasal and intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins[J]. *Int J Pharm*, 2009, **381**(1): 49 – 55.
- [8] Kamei N, Takeda-Morishita M. Brain delivery of insulin boosted by intranasal coadministration with cell-penetrating peptides [J]. *J Control Release*, 2015, **197**: 105 – 110.
- [9] Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, et al. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide [J]. *Drug Discov Today*, 2015, **20**(1): 76 – 85.
- [10] Meloni BP, Milani D, Edwards AB, et al. Neuroprotective peptides fused to arginine-rich cell penetrating peptides; neuroprotective mechanism likely mediated by peptide endocytic properties[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, **153**: 36 – 54.
- [11] Herce HD, Garcia AE, Litt J, et al. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides [J]. *Biophys J*, 2009, **97**(7): 1917 – 1925.
- [12] Yin W, Cao G, Johnnides MJ, et al. TAT-mediated delivery of Bcl-xL protein is neuroprotective against neonatal hypoxic-ischemic brain injury via inhibition of caspases and AIF[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, **21**(2): 358 – 371.
- [13] Namikoshi A, Wu JL, Yamashita T, et al. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus[J]. *Aquaculture*, 2004, **229**(1/2/3/4): 25 – 35.
- [14] Yu HY, Chen S, Xu Z, et al. Protective effect of fibroin peptides on A β_{25-35} -induced injury in SH-SY5Y cells and its mechanism [J]. *J China Pharm Univ*, 2017, **48**(5): 609 – 613.
- [15] Ishii M, Iadecola C. Metabolic and non-cognitive manifestations of Alzheimer's disease: the hypothalamus as both culprit and target of pathology[J]. *Cell Metab*, 2015, **22**(5): 761 – 776.
- [16] Higuchi M, Maeda J, Ji B, et al. In-vivo visualization of key molecular processes involved in Alzheimer's disease pathogenesis: Insights from neuroimaging research in humans and rodent models[J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2010, **1802**(4): 373 – 388.
- [17] Anand A, Patience AA, Sharma N, et al. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: a comprehensive review[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, **815**: 364 – 375.
- [18] Guo JJ, Liao H. Development of drug for Alzheimer's disease [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2010, **41**(5): 395 – 400.
- [19] Sanguanmoo P, Tanajak P, Kerdphoo S, et al. FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats[J]. *Horm Behav*, 2016, **85**: 86 – 95.
- [20] Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview[J]. *J Chromatogr B*, 2005, **827**(1): 65 – 75.
- [21] Bhat AH, Dar KB, Anees S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases: a mechanistic insight[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, **74**: 101 – 110.