

基于表达荧光蛋白的海分枝杆菌感染斑马鱼模型的抗结核药物评价方法的研究

杨国威*, 彭世泽*, 赵建元, 张永欣, 岑山

【摘要】

目的 为了提高基于荧光检测的海分枝杆菌-斑马鱼感染模型的灵敏度和准确度,我们构建了毒力较弱的可以表达红色荧光蛋白的重组菌 Mm927-pR2HYG,建立了斑马鱼感染模型,用于抗结核药物的药效评价和筛选。

方法 重组菌 Mm927-pR2HYG 经受精卵卵黄囊注射感染斑马鱼幼鱼,通过测定斑马鱼致死率确定其对斑马鱼的感染性,并在激光共聚焦显微镜下观察其在斑马鱼体内的分布。同时应用荧光像素计数法对异烟肼和利福平的治疗效果进行评价。

结果 成功构建了表达荧光蛋白的重组海分枝杆菌 Mm927-pR2HYG 感染斑马鱼模型。异烟肼和利福平两种抗结核药物在该模型中均具有良好的治疗作用;应用荧光像素计数法和 qPCR 计数法进行的药效评价结果具有较好的一致性。

结论 重组海分枝杆菌 Mm927-pR2HYG 感染斑马鱼模型结合荧光像素计数法是一种快速、高效、直观的药物体内评价系统,可以用于抗结核药物的高通量筛选。

【关键词】 斑马鱼; 抗结核药; 药物评价; 重组海分枝杆菌; 荧光像素计数法

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2019, 14(4):316-321

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌感染导致的一种慢性传染病,具有较高的死亡率。全世界每年约有 900 万新增病例,死亡人数高达 170 万,其中肺结核位列世界十大死因之一,严重威胁着人类健康^[1]。目前临床上应用的抗结核一线药物包括异烟肼 (INH)、利福平 (RFP)、乙胺丁醇 (EB)、吡嗪酰胺 (PZA)、链霉素 (SM) 五种,能够治疗 80% 以上的新感染结核患者。但是近年来随着耐药结核菌 (MDR-TB 和 XDR-TB) 的不断出现,导致耐药结核病的发病率日益上升^[2-3],再次让结核病患者处于无药可医的窘境,因此,发展新型抗结核药物以及更有效的疫苗迫在眉睫。

新型抗结核药物的研发依赖于理想的动物模型和筛选方法的建立,但是由于结核分枝杆菌本身的生长特性以及较高的生物安全级别,使得结核病动物模型成为抗结核药物研发的瓶颈。常见的动物模型比如灵长类动物和啮齿类动物,由于伦理、成本以及无法完全模拟结核病在人体内的进展等原因,都不适用于大规模的体内药物筛选^[4-5]。而斑马鱼因其通体透明,体型小巧易繁殖,与哺乳动物的基因相似度高等优点被广泛用于多种疾病的致病机制研究^[6-7]。同时以斑马鱼为宿主的海分枝杆菌与结核分枝杆菌的基因相似度高达 85% 以上^[8],感染后也能形成干酪样肉芽肿病变,且生长快,传染性小,可在 BSL-2 实验室开展研究,使其成为研究结核分枝杆菌的优良模式病原^[9-10]。基于上述原因,海分枝杆菌感染斑马鱼模型已被用于结核病的致病机制和发病病程等基础研究^[11-12],也有望为抗结核药物的筛选和评价提供良好的分析平台。

利用斑马鱼的光学透明度,将表达荧光蛋白的重组海分枝杆菌经尾静脉注射感染受精后 1 d 的斑马鱼幼鱼,通过检测荧光蛋白的表达间接反映海分枝杆菌的增殖状态,可以建立基于荧光的快速药物筛选平台^[13]。现阶段研究中常用的重组菌为毒力较强的海分枝杆菌 M 株。然而我们在前期的研究中发现斑马鱼鱼卵对毒力较弱的海分枝杆菌 927 株的耐受性远远大于对毒力较强的海分枝杆菌 M 株。鉴于重组菌的荧光强度与细菌数目呈正相关,斑马鱼体内能够耐受的细菌数目越多,荧光

基金项目:中国医学科学院医学与健康创新工程(2017-I2M-1-012 YXZ)

作者单位:100124 北京,首都医科大学附属北京友谊医院北京热带医学研究所(杨国威);100050 北京,中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所以免疫生物学室(彭世泽、赵建元、张永欣、岑山)

通信作者:张永欣,Email: yongxinzhang@imb.pumc.edu.cn;岑山,Email: shancen@imb.pumc.edu.cn

收稿日期:2019-03-25

*同为第一作者

检测的灵敏度和准确性就越高,因此我们拟构建表达红色荧光蛋白的重组海分枝杆菌 927 株 (Mm927-pR2HYG)用于斑马鱼幼鱼感染模型的建立,并结合荧光像素计数法,探索该模型在抗结核药物筛选与评价中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭质粒 pR2HYG,具有潮霉素抗性,表达红色荧光蛋白,由剑桥大学医学系 Lalita Ramakrishnan 博士惠赠。

1.1.2 菌株 海分枝杆菌 M 株(ATCC BAA-535)和 927 株(ATCC 927)接种于 7H11 固体培养基,30 °C 倒置培养 5~7 d。挑取海分枝杆菌单菌落,转入含有 7H9 液体培养基的试管中,30 °C 静置培养 5~7 d。以 1:100 体积比将上述海分枝杆菌菌液接种于摇瓶的 7H9 液体培养基中,30 °C、180 r/min 振荡培养至对数生长期。

1.1.3 实验动物 斑马鱼 (*Danio rerio*) AB 系,由本所张靖溥教授惠赠。斑马鱼养殖于 28 °C 的人工海水中(盐浓度为 28‰),采用人工光源对斑马鱼的生活周期进行调控,照明 14 h/黑暗 10 h 交替进行。饵料选用孵化 24 h 的丰年虾,每日中午饲喂 1 次。本次动物实验依据研究所《实验动物管理条例》中的相关实验动物伦理规范进行操作。

1.1.4 试剂和仪器 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒为日本 Takara 公司产品;Stratagene Mx3000P 型 PCR 仪为美国 Agilent 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 显微注射 将菌液吸入由毛细玻璃管制成的注射针中(3~5 μm)。在 100 倍放大镜下,注射入 1~4 细胞期斑马鱼受精卵的卵黄囊中,注射的溶液体积约为 10 pL。

1.2.2 重组海分枝杆菌 927 株(Mm927-pR2HYG)的构建 制备海分枝杆菌的感受态细胞,将 1 μg 表达荧光蛋白的重组质粒(pR2HYG)加到 400 μL 海分枝杆菌感受态细胞中,充分混匀,冰浴 10 min。然后转入预冷的电穿孔杯中(直径为 2 mm),在电压 2.5 kV,电容 50 μF,电阻 720 Ω 的条件下进行电穿孔转化,脉冲时间 12~16 ms,放电完毕后立即冰浴 10 min。转化后的海分枝杆菌于不含抗生

素的 7H9 液体培养基中培养 2~3 h,4000 r/min 离心 10 min 后弃上清,加入 500 μL 新鲜的 7H9 液体培养基重悬。取 50~100 μL 菌液涂布于含有 50 μg/ml 潮霉素的 7H11 固体培养基平板表面,于 37 °C 静置培养 3~5 d。

1.2.3 qPCR 计数法 该方法是通过检测海分枝杆菌 16S~23S ITS 的拷贝数来对斑马鱼体内的细菌数目进行定量。16S~23S ITS 通常在一套海分枝杆菌的基因组里只有一个拷贝^[14],因此可以用于反映细菌的数目。用 Qiagen 试剂盒提取样品中的基因组 DNA。扩增引物为: F 5' CACCACGAGA AACACTCCAA 3'; R 5' ACATCCCGAAACCAAC AGAG 3'。实时荧光定量 PCR 反应体系为 Mix 12.5 μL、10 mmol/L 引物各 1 μL、DNA 3 μL,用 ddH₂O 补至 20 μL。反应条件为 95 °C 10 s,65 °C 34 s,共 40 个循环。每个样品设置 3 个重复,计算各个样品的平均 CT 值。细菌计数采用绝对定量的方法并绘制标准曲线。将经涂布平板计数的海分枝杆菌梯度稀释作为标准品与斑马鱼幼鱼混合,按照上述实时荧光定量 PCR 方法计算每个稀释度标准品的 CT 值,用 GraphPad Prism 5.01 软件绘制标准曲线。根据标准曲线和待测样品的平均 CT 值,计算斑马鱼体内的细菌数量。

1.2.4 荧光像素计数法 携带表达荧光蛋白质粒的重组海分枝杆菌感染斑马鱼后,在激光共聚焦显微镜下使用激发波长为 561 nm 的红色荧光通道进行成像观察,使用 velocity library 软件测量每条斑马鱼的荧光值,同时将 8 条未感染斑马鱼的平均荧光值作为本底,用感染组斑马鱼的荧光值减去本底就是感染斑马鱼体内细菌发出的荧光值,间接反映了细菌的数量。

1.2.5 抗结核药物处理 海分枝杆菌感染斑马鱼鱼卵 24 h 后,向海水中分别加入终浓度为 2 mmol/L 的异烟肼和 400 μmol/L 的利福平进行药物处理,每天更换海水并重新加药。对照组不给药,每天只更换海水。

1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 5.01 软件对数据进行分析,两组间数据比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 表达荧光蛋白的海分枝杆菌 927 株斑马鱼幼鱼感染模型的建立

由于之前的大部分研究都是使用海分枝杆菌 M 株进行斑马鱼鱼卵的感染,而关于使用重组的海分枝杆菌 927 株进行感染的研究鲜有报道,因此我们首先检测了重组菌 927 株对斑马鱼幼鱼的致死作用。采用人工注射的方式分别将相同菌量的重组菌 M 株和重组菌 927 株注射到受精后 2 h 的斑马鱼鱼卵的卵黄囊中,同时以 PBS 注射组作为对照。连续观察 10 d,记录每天斑马鱼幼鱼的死亡数量,绘制生存曲线。结果显示,在相同注射剂量的情况下 ($OD = 1$),两株重组菌对斑马鱼幼鱼具有相似的致死作用,在感染后第 4 天开始出现幼鱼的死亡,至第 8 天后死亡率达到最高(图 1),说明表达荧光蛋白的重组海分枝杆菌 927 株能够通过卵黄囊注射的方式有效地感染斑马鱼幼鱼,可以用于斑马鱼幼鱼感染模型的构建。

为了了解重组菌 Mm927-pR2HYG (195 ± 58 CFU) 经卵黄囊注射后在斑马鱼幼鱼体内的分布,我们在激光共聚焦显微镜下对感染 5 d 后的斑马鱼幼鱼进行观察。图 2 结果显示,重组菌

Mm927-pR2HYG 感染斑马鱼 5 d 后,已经从卵黄囊位置扩散到了头部、尾部以及腹部的区域。这个结果与已报道的野生型海分枝杆菌 927 株感染鱼卵后使用 Ziehl-Neelsen 抗酸性染色法观察到的结果一致,进一步明确了使用表达荧光蛋白的重组海分枝杆菌 927 株构建斑马鱼幼鱼感染模型的可行性。

2.2 应用荧光像素计数法在幼鱼感染模型中评价抗结核药物的疗效

为了初步验证重组菌 Mm927-pR2HYG 感染模型是否可以用于抗结核药物的药效评价,本研究选择一线抗结核药物异烟肼和利福平分别处理感染了重组菌 Mm927-pR2HYG 的斑马鱼幼鱼,同时以不给药组作为对照,于感染后 5 d 用激光共聚焦显微镜进行成像观察,对药物的给药效果进行评价。图 3 结果显示对照组斑马鱼体内的海分枝杆菌分布全身,在腹部、头部以及尾部都有大量表达红色荧光蛋白的重组菌存在。而在用 2 mmol/L 异烟肼和 400 μ mol/L 利福平分别处理的给药组,斑马鱼体内均没有检测到红色荧光,说明这两种药物可以显著抑制斑马鱼幼鱼体内的细菌数量,在该感染模型中具有明显的抗结核疗效。

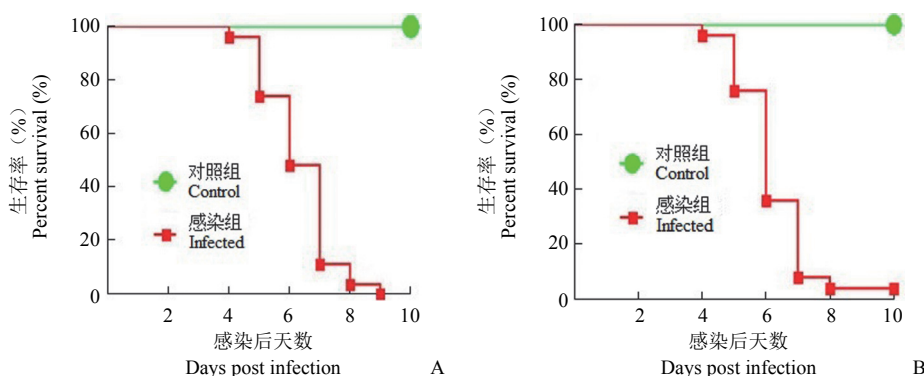


图 1 不同海分枝杆菌菌株对斑马鱼幼鱼的致死作用 (A: 重组海分枝杆菌 M 株感染斑马鱼后的生存曲线; B: 重组海分枝杆菌 927 株感染斑马鱼后的生存曲线)

Figure 1 Lethality of zebrafish infected by different recombinant *M. marinum* strains (A: Survival curve of zebrafish infected by recombinant *M. marinum* M strain; B: Survival curve of zebrafish infected by recombinant *M. marinum* 927 strain)

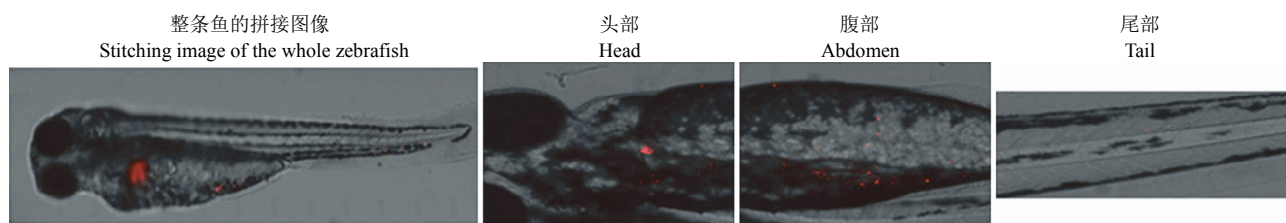


图 2 Mm927-pR2HYG 经卵黄囊注射后在感染斑马鱼体内的分布

Figure 2 The distribution of the recombinant strain Mm927-pR2HYG in the infected zebrafish by yolk sac injection

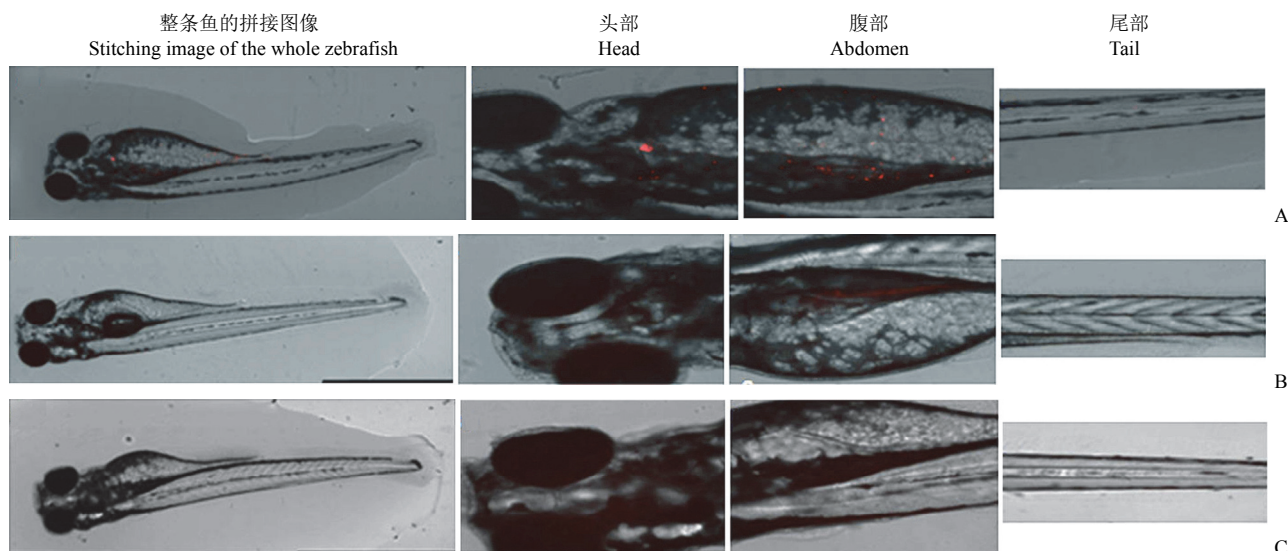


图 3 激光共聚焦显微镜下观察到抗结核药物可以显著抑制感染 Mm927-pR2HYG 5 d 后斑马鱼模型中的细菌数量 (A: 对照组; B: 异烟肼处理组; C: 利福平处理组; 放大倍数 200 \times)

Figure 3 Mm927-pR2HYG can be significantly inhibited by anti-tuberculosis drugs in the zebrafish infection model. 5 days post infection, the distribution of Mm927-pR2HYG was detected by confocal microscopy (A: Control group; B: Isoniazid treatment group; C: Rifampicin treatment group; With magnification of 200)

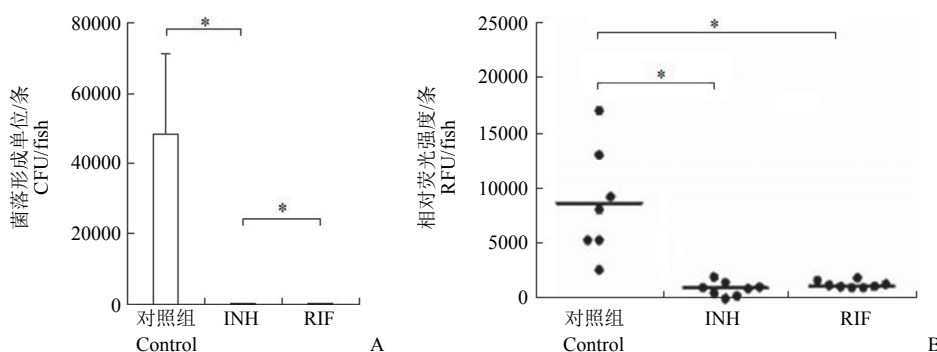


图 4 qPCR 计数法 (A) 和荧光像素计数法 (B) 在抗结核药物药效评价中的应用和比较 (* $P < 0.05$)

Figure 4 The application and comparison of qPCR counting method (A) and fluorescent pixel counting (B) in the evaluation of anti-tuberculosis drugs (* $P < 0.05$)

为进一步量化该斑马鱼感染模型幼鱼体内的细菌数量, 消除荧光检测的主观性偏差, 我们建立了目前国际上常用的荧光像素计数法, 对感染 5 d 后的斑马鱼幼鱼体内的细菌数量进行半定量检测; 同时应用我们之前已经建立的基于 qPCR 的细菌计数法作为对照, 通过比较两种方法的药效评价结果验证其可靠性。如图 4 结果所示, 野生型海分枝杆菌 927 株感染斑马鱼 5 d 后, 对照组中斑马鱼幼鱼体内的细菌数量经 qPCR 计数法计算可达 4×10^4 CFU, 而在 2 mmol/L 异烟肼和 400 μ mol/L 利福平的药物处理组, 斑马鱼体内的海分枝杆菌由于受到抗结核药物的抑制, 不再生长。同时在重组菌感染的斑马鱼对照组中, 荧光像素值与药物处理

组相比也有显著的增高, 而异烟肼和利福平两组的荧光像素值差别不大, 与 qPCR 计数法的结果一致, 证明荧光像素计数法可以在重组菌 Mm927-pR2HYG 感染的斑马鱼模型中用于抗结核药物的药效评价。

3 讨论

为了提高基于荧光检测的海分枝杆菌感染斑马鱼模型的灵敏度和准确度, 我们构建了毒力较弱的能够表达红色荧光蛋白的重组海分枝杆菌 Mm927-pR2HYG, 探讨了其用于斑马鱼感染模型的可行性。通过受精卵卵黄囊注射感染后, 重组菌 927 株与毒力较强的重组菌 M 株相比, 具有相似

的斑马鱼幼鱼致死率, 证明重组菌 Mm927-pR2HYG 可以有效地感染斑马鱼幼鱼, 适用于斑马鱼感染模型的构建。同时卵黄囊注射相比传统的尾静脉注射, 极大地提高了操作效率, 为大规模体内药物筛选和评价提供了可能。

该感染模型结合荧光像素计数法可以半定量检测斑马鱼体内感染的细菌数量, 与我们之前建立的 qPCR 计数法相比较, 两者对异烟肼和利福平的药效评价结果具有一致性, 证明了该模型应用荧光像素计数法进行药效评价的可靠性。虽然该方法不能绝对定量感染的细菌数量, 并且检测窗口与 qPCR 计数法比相对狭窄, 但是基于荧光检测的感染模型可以更加简便、直观地对药物的作用做出判断, 允许快速、连续和高通量的数据收集, 更加适合高通量的抗结核药物的筛选和评价。结合 Ziehl-Neelsen 染色、病理组织切片以及 qPCR 计数法可以更加系统、深入地对药物的给药效果进行分析。

参考文献

- [1] Korenromp EL, Bierrenbach AL, Williams BG, et al. The measurement and estimation of tuberculosis mortality. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(3):283-303.
- [2] Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*, 2008, 29(2):283-294.
- [3] Kuijl C, Savage ND, Marsman M, et al. Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1. *Nature*, 2007, 450(7170):725-730.
- [4] Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(1):29-40.
- [5] Pethe K, Sequeira PC, Agarwalla S, et al. A chemical genetic screen in *Mycobacterium tuberculosis* identifies carbon-source-dependent growth inhibitors devoid of in vivo efficacy. *Nat Commun*, 2010, 1:57.
- [6] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 1996, 123:37-46.
- [7] Rudner LA, Brown KH, Dobrinski KP, et al. Shared acquired genomic changes in zebrafish and human T-ALL. *Oncogene*, 2011, 30(41):4289-4296.
- [8] Traver D, Herbomel P, Patton EE, et al. The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Adv Immunol*, 2003, 81:253-330.
- [9] Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*, 2009, 136(1):37-49.
- [10] Martin CS, Moriyama A, Zon LI. Hematopoietic stem cells, hematopoiesis and disease: lessons from the zebrafish model. *Genome Med*, 2011, 3(12):83.
- [11] Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE, et al. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect Immun*, 2006, 74(11):6108-6117.
- [12] Volkman HE, Clay H, Beery D, et al. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS Biol*, 2004, 2(11):e367.
- [13] Takaki K, Cosma CL, Troll MA, et al. An in vivo platform for rapid high-throughput antitubercular drug discovery. *Cell Rep*, 2012, 2(1):175-184.
- [14] Bold TD, Ernst JD. Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? *Cell*, 2009, 136(1):17-19.

Application of fluorescent protein expressing *Mycobacterium.marinum* infected zebrafish in the evaluation of anti-tuberculosis drugs

YANG Guo-wei, PENG Shi-ze, ZHAO Jian-yuan, ZHANG Yong-xin, CEN Shan

【Abstract】

Objective In order to improve the sensitivity and accuracy of the fluorescence-based *M. marinum* infected zebrafish model, we constructed an attenuated recombinant strain Mm927-pR2HYG, which expresses red fluorescent protein, to establish a zebrafish infection model for the evaluation and screening of anti-tuberculosis drugs.

Methods The recombinant strain Mm927-pR2HYG was infected into zebrafish by yolk sac injection and the lethality of the infected zebrafish and the distribution of Mm927-pR2HYG in the infected zebrafish were determined. Moreover, the therapeutic effects of isoniazid and rifampicin were evaluated by fluorescence pixel counting.

Results The Mm927-pR2HYG-zebrafish infection model was successfully constructed. The results showed that both isoniazid and rifampicin had good efficacy in this model. Both evaluation methods of fluorescence pixel counting and qPCR counting exhibited good consistency.

Conclusion This study demonstrates that Mm927-pR2HYG-zebrafish infection model combined with fluorescence pixel counting is a rapid, efficient and visual *in-vivo* evaluation system, which can be used for high-throughput screening of anti-tuberculosis drugs.

【Key words】 Zebrafish; Antitubercular agents; Drug evaluation; Recombinant Mycobacterium marinum; Fluorescence pixel counting

Author Affiliations: Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100124, China (YANG Guo-wei); Department of Immunology, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China (PENG Shi-ze, ZHAO Jian-yuan, ZHANG Yong-xin, CEN Shan)

Corresponding Authors: ZHANG Yong-xin, Email: yongxinzhang@imb.pumc.edu.cn; CEN Shan, Email: shancen@imb.pumc.edu.cn

www.cmbp.net.cn

Chin Med Biotechnol, 2019, 14(4):316-321

(上接第 357 页)

- [44] Yao W, Zhao H, Shi R, et al. Recombinant protein transduction domain-Cu/Zn superoxide dismutase alleviates bone cancer pain via peroxiredoxin 4 modulation and antioxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(4):1143-1148.
- [45] Zhang S, Cao Y, Xie L, et al. Effect of superoxide dismutase-entrapped liposomes and protein transduction domain-superoxide dismutase on human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4):1427-1433.
- [46] Meng LH, Xue RL. Progress of protein transduction domain-superoxide dismutase fusion protein in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Int J Anesth Resuscitation*, 2014, 35(2):188-192. (in Chinese) 孟丽华, 薛荣亮. 蛋白质转导超氧化物歧化酶融合蛋白在脑缺血/缺氧损伤中的研究进展. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2014, 35(2):188-192.
- [47] Wang Y, Liu JY, Zeng WJ, et al. Effects of Cu/Zn SOD mediated by cell penetrating peptide PTD4 on hypoxia/reoxygenation injury in myocardial cells of rats. *Mod Med J*, 2017, 45(10):1396-1399. (in Chinese) 王宇, 刘菊英, 曾文静, 等. PTD4-Cu/Zn-SOD 融合蛋白对大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤的影响. *现代医学*, 2017, 45(10):1396-1399.
- [48] Liu M, Li S, Zhang Q, et al. Oral engineered *Bifidobacterium longum* expressing rhMnSOD to suppress experimental colitis. *Int Immunopharmacol*, 2018, 57:25-32.
- [49] Jia J, Chen F, Wu Y. Recombinant PEP-1-SOD1 improves functional recovery after neural stem cell transplantation in rats with traumatic brain injury. *Exp Ther Med*, 2018, 15(3):2929-2935.
- [50] Yoo DY, Kim DW, Chung JY, et al. Cu, Zn-Superoxide dismutase increases the therapeutic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells by maintaining antioxidant enzyme levels. *Neurochem Res*, 2016, 41(12):3300-3307.
- [51] Jia JM, Pu XK. PEP-1-SOD1 fusion protein: preparation, expression and purification. *Acta Acad Med Xuzhou*, 2015, 35(2):105-108. (in Chinese) 贾进明, 濮翔科. PEP-1-SOD1 融合蛋白的制备、表达及纯化. *徐州医学院学报*, 2015, 35(2):105-108.
- [52] Sheng MM, Lv YH, Li RK, et al. Construction of superoxide dismutase-catalase fusion gene and its expression in *Escherichia coli*. *J Fuzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 2012, 40(1):119-125, 131. (in Chinese) 盛明明, 吕元辉, 李仁宽, 等. 人超氧化物歧化酶-过氧化氢酶融合基因的构建、表达及其产物的初步纯化和性质研究. *福州大学学报 (自然科学版)*, 2012, 40(1):119-125, 131.
- [53] Pan JR, Wu LQ, He HC, et al. Expression, purification, stability and transduction efficiency of GST-SOD1-R9 fusion protein. *Chin J Biotechnol*, 2017, 33(5):828-837. (in Chinese) 潘剑茹, 吴伦巧, 何火聪, 等. GST-SOD1-R9 融合蛋白的表达、纯化、稳定性与跨膜效应. *生物工程学报*, 2017, 33(5):828-837.
- [54] Pan J, Li L, Liang L, et al. Cytoprotective effects of cell-permeable bifunctional antioxidant enzyme, GST-TAT-SOD, against cisplatin-induced cell damage. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:9530791.
- [55] Pan J, He H, Su Y, et al. In vivo radioprotective activity of cell-permeable bifunctional antioxidant enzyme GST-TAT-SOD against whole-body ionizing irradiation in mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:2689051.
- [56] Luangwattananun P, Eiamphungporn W, Songtawe N, et al. Improving enzymatic activities and thermostability of a tri-functional enzyme with SOD, catalase and cell-permeable activities. *J Biotechnol*, 2017, 247:50-59.
- [57] Iannitti T, Scarrott JM, Likhite S, et al. Translating SOD1 gene silencing toward the clinic: a highly efficacious, off-target-free, and biomarker-supported strategy for fALS. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12:75-88.
- [58] Farias ICC, Mendonça-Belmont TF, da Silva AS, et al. Association of the SOD2 polymorphism (Val16Ala) and SOD activity with vaso-occlusive crisis and acute splenic sequestration in children with sickle cell anemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2018, 10(1):e2018012.
- [59] Kogawa K, Muramatsu H, Tanaka M, et al. Enhanced inhibition of experimental metastasis by the combination chemotherapy of Cu-Zn SOD and adriamycin. *Clin Exp Metastasis*, 1999, 17(3):239-244.
- [60] Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res*, 2006, 55(9):359-363.