

人酸性成纤维细胞生长因子与穿膜肽融合蛋白在鼠体内的药代动力学及血脑屏障通透性研究

杨鹏辉¹, 许 华¹, 张齐好², 李 娟¹, 熊耀玲¹, 黄亚东², 苏志坚², 郑 青^{1*}

(暨南大学 1. 药学院, 2. 医药生物技术研究开发中心, 广东 广州 510632)

摘要: 研究穿膜肽 (transcriptional activator protein, TAT) 和人酸性成纤维细胞生长因子 (human acidic fibroblast growth factor, haFGF) 融合蛋白 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 静脉注射 (iv) 后在大鼠血浆中的药代动力学特性, 并探讨其在大鼠和小鼠体内血脑屏障的通透性, 为阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 的临床治疗用药提供依据。酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测静脉注射后 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 在大鼠血浆和小鼠脑匀浆液的含量, 免疫组织化学法检测大鼠和小鼠脑中的分布。结果表明, 大鼠单次颈静脉注射 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 血药浓度-时间曲线符合二室开放模型, 加权重为 $1/C^2$, 属于线性动力学消除, 其中, 分布半衰期为 (0.049 ± 0.03) h, 消除半衰期为 (0.55 ± 0.05) h。结果提示, TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 在体内消除较快, 可以迅速穿过血脑屏障, 分布于大脑皮质和海马区, 并定位于细胞核。

关键词: 穿膜肽; 血脑屏障; 药代动力学; 酸性成纤维细胞生长因子; 阿尔茨海默症

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 10-1204-05

Pharmacokinetics of a fusion protein for human acidic fibroblast growth factor and transcriptional activator protein in rat and its penetration across blood-brain barrier

YANG Peng-hui¹, XU Hua¹, ZHANG Qi-hao², LI Juan¹, XIONG Yao-ling¹,
HUANG Ya-dong², SU Zhi-jian², ZHENG Qing^{1*}

(1. College of Pharmacy, 2. Biopharmaceutical Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: This paper is to report the study of the pharmacokinetics of a fusion protein TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ for human acidic fibroblast growth factor and transcriptional activator protein in rat plasma, and the investigation of their penetration across blood-brain barrier in mice and rats, in order to provide a basis for clinical development and treatment of Alzheimer's disease. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine concentration of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ in rat plasma and in mouse brain homogenate; and immunohistochemistry was used to analyze the distribution in brain. The concentration-time curve fitted two-compartment open model which was linear kinetics elimination after a single intravenous injection of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ in rat at the dose of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The half life time was 0.049 ± 0.03 h for distribution phase and 0.55 ± 0.05 h for elimination phase, and the weight was $1/C^2$. The result showed that TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ could be detected in the brain by ELISA and immunohistochemistry, the elimination of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ in rat was swift, and TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ could penetrate across the blood-brain barrier, distribute in pallium and hippocampus and locate in the nucleus.

Key words: transcriptional activator protein; blood-brain barrier; pharmacokinetics; acidic fibroblast growth factor; Alzheimer's disease

收稿日期: 2011-06-17.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZX09103-749); 广东省重大科技专项“重大新药创制”课题 (2011A080502014).

*通讯作者 Tel: 86-20-85221865, Fax: 86-20-85221303-808, E-mail: tzhengq@jnu.edu.cn

人酸性成纤维细胞生长因子 (human acidic fibroblast growth factor, haFGF) 在神经系统方面具有多种生物学功能。临床研究表明: haFGF 对脊髓损伤患者具有神经修复功能^[1]; 另外, haFGF 可以抑制中枢神经元的凋亡, 促进轴突修复, 减少海马细胞的缺失和神经元的变性^[2]。野生型 haFGF 由 154 个氨基酸残基构成, 在天然状态下, haFGF N 端不稳定, 部分氨基酸残基易降解。本实验中采用的 haFGF₁₄₋₁₅₄ 是将野生型 haFGF 去除 N 端 13 个不稳定氨基酸的改构体, 研究表明, haFGF₁₄₋₁₅₄ 在显著提高稳定性的同时, 保留了野生型 haFGF 的促分裂和非促分裂等多种生物学功能。

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的中枢神经系统退行性疾病, 其主要病理特征包括在大脑皮层和海马出现 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β protein, A β) 聚集形成的老年斑 (SP), Tau 蛋白异常磷酸化聚集形成的神经纤维缠结 (NFT) 以及大脑皮层和海马区神经细胞减少^[3]。目前的治疗药物只能缓解 AD 患者的症状, 无法从根本上治疗。基于 haFGF 在神经系统方面的多种功能, 使其具有开发成为治疗 AD 新型药物的良好前景。

然而 haFGF 分子量较大, 难以穿过血脑屏障, 从而阻碍了其发挥脑部疾病治疗的作用。穿膜肽 TAT (transcriptional activator protein) 是一种带正电荷的短肽, 它可以携带多种大分子物质穿过细胞膜运送到细胞内。近年来, 将穿膜肽与蛋白药物融合, 利用 TAT 介导大分子到达脑部的报道日趋增多: Cai 等^[4] 利用穿膜肽介导分子质量较大 (17 kD) 的脑红蛋白进入小鼠脑内, 保护受损大脑; 研究表明: TAT-FNK、TAT-Bcl-xL、TAT-GDNF、TAT-XIAP、TAT-Hsp70 等均可以穿过未受损的血脑屏障, 发挥对脑部疾病的治疗作用^[5-9]。而本实验室前期研究表明: haFGF 改构体对 A β 所致大鼠海马神经元细胞毒性具有显著的保护作用, 与 TAT 融合可以快速穿过 PC12、HaCaT 和海马神经元等细胞的细胞膜^[10]。综上所述, 由于穿膜肽具有可以携带多种大分子物质穿过细胞膜进入细胞的特性, 为生物大分子用于疾病治疗带来了曙光^[11], 本实验将考察 TAT 与 haFGF 的融合蛋白静脉用药后在鼠体内的药代动力学特点及其血脑屏障通透性, 旨在为其临床应用提供参考。

材料与方 法

实验动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌雄各半, 体重 (250 \pm 30) g; 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重

(21 \pm 2) g, 购自广东省医学实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤) 2008-0002。

药品及试剂 ELISA kit (武汉新启迪生物科技有限公司); 鼠抗人 aFGF 单克隆抗体 (R&D 公司); 免疫组化二抗试剂盒 (博士德公司); TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ (纯度: 92.7%, 批号: 20110314, 活性: 5.1×10^8 IU \cdot g⁻¹) 和 haFGF₁₄₋₁₅₄ (纯度: 97%, 批号: 20110313, 活性: 4.5×10^8 IU \cdot g⁻¹) 由暨南大学医药生物技术研究开发中心 (广州) 提供。

主要仪器和设备 全自动酶标仪 (Thermo Lab Systems); 倒置荧光显微镜 (Olympus Co); 电热恒温培养箱 (上海-恒科学仪器有限公司)。

标准曲线的绘制 将大鼠空白血清稀释 10 倍, 取 1 mL 加入 haFGF 标准品, 混匀, 将 haFGF 配制成 2 000、1 000、500、250、125、62.5 和 31.25 ng \cdot L⁻¹ 等浓度, 各取 100 μ L 加入酶标板, 终止反应后于酶标仪 450 nm 处检测吸收度 (A) 值, 绘制标准曲线。

加样回收率检测 用 10 倍稀释后的空白血浆将 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 配制成 2 000、500、125 和 31.25 ng \cdot L⁻¹ 等 4 个浓度, 每个浓度 5 孔, 计算回收率。

精密度测定 用 10 倍稀释后的空白血浆将 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 配成 2 000、500、125 和 31.25 ng \cdot L⁻¹ 等 4 个浓度, 每个浓度同一块板测定 5 次, 分别用 5 块不同板检测, 计算板内和板间精密度。

血浆药物浓度检测 取大鼠 8 只, 雌雄各半, 戊巴比妥钠 (4 g \cdot kg⁻¹) 腹腔注射麻醉, 分离颈静脉, 插管, 用大头针牵引插管穿过皮肤, 在头顶打结, 缝合伤口, 单笼饲养; 24 h 后经插管注射 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ (300 μ g \cdot kg⁻¹), 给药后 2、5、10、15、30、60、90、120 和 180 min, 从插管中取血, 离心取上清液。将血浆样品稀释 10 倍, 加入酶标板进行反应, 酶标仪 450 nm 处检测吸收度 (A) 值, 代入标准曲线计算血药浓度, 绘制血浆药物浓度-时间曲线, 计算药代动力学参数。

大脑样本获取 取小鼠 45 只, 分为 9 组, 每组 5 只, 分别尾静脉注射剂量为 300 μ g \cdot kg⁻¹ 的 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 和 haFGF₁₄₋₁₅₄, 空白对照组注射同等剂量的 PBS。给药后 15、30、60 和 120 min 取大脑, 分为两半, 一半放入 4%多聚甲醛, 另一半 -80 $^{\circ}$ C 保存。取大鼠 9 只, 分为 3 组, 每组 3 只, 给药后 120 min 取脑, 全脑置于 4%多聚甲醛。

脑匀浆液中融合蛋白含量检测 首先制备标准曲线, 其次将小鼠脑组织按照每 0.2 g 组织加 1 mL

PBS 的比例, 将组织充分匀浆, 离心取上清液; 取上清液 100 μL 加入 96 孔酶标板反应, 450 nm 处检测吸收度值, 计算各时间点融合蛋白含量, 并换算成与组织的比重值。

免疫组织化学法检测大脑中分布 将置于多聚甲醛中的脑组织经脱水、透明、浸蜡、包埋后, 进行石蜡切片 (厚 3 μm), 自然晾干, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片备用。然后将石蜡切片依次经脱蜡、抗原修复、增加膜通透性、封闭内源性过氧化物酶、封闭、孵育一抗、二抗、DAB 显色、苏木素复染、脱水透明、封片、拍照。

数据处理 方法学研究所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 药代动力学数据用 3p97 软件进行处理。

结果

1 标准曲线

用空白大鼠血浆 10 倍稀释液配制成不同浓度 haFGF, 酶标仪 450 nm 处检测其吸收度 (A) 值, 所得标准曲线为 $y = 0.0007x + 0.068$, $R^2 = 0.9979$, 说明在 31.25~2 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性良好。

2 加样回收率

在检测浓度范围内所取 31.25、125、500 和 2 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 等 4 个浓度的加样回收率分别为 (118.62 \pm 9.2) %、(110.24 \pm 7.8) %、(86.92 \pm 4.2) % 和 (95.07 \pm 1.5) % ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$), 相对标准偏差分别为 7.93、7.03、4.79 和 1.60。结果显示, 高浓度回收率较高, 且相对标准偏差也小; 而浓度越低, 相对标准偏差越大, 相对标准偏差 RSD (%) < 8%, 回收率上下波动在 20% 以内。

3 精密度

因为必须在终止反应后 30 min 内检测吸收度 (A) 值, 所以板内精密度检测的时间间隔为 5 min, 重复 5 次; 31.25、125、500 和 2 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 等 4 个浓度的板间精密度分别为 8.46、6.91、7.66 和 4.09, 板内精密度分别为 2.96、1.31、1.62 和 0.27。结果显示, 浓度越高, 板间和板内相对标准偏差 (RSD) 越小, 而低浓度相对标准偏差较大; 板内相对标准偏差小, 均 < 3%, 板间相对标准偏差均在 10% 以内, 说明重现性较好, 方法可靠。

4 大鼠静脉注射 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 药代动力学

4.1 血浆药物浓度-时间曲线 大鼠静脉注射融合蛋白 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 后各时间点血药浓度随时间变化曲线见图 1。

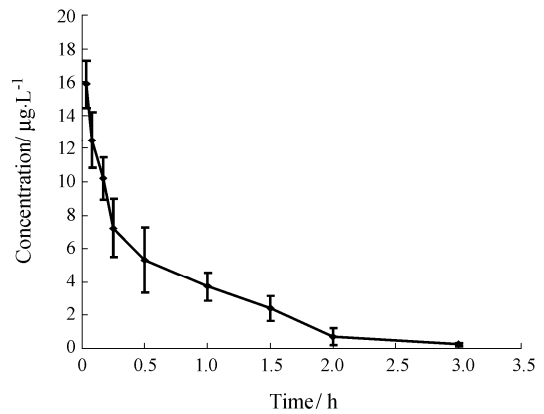


Figure 1 Concentration-time curve of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ after iv 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in rat plasma ($n = 8$)

4.2 药代动力学参数 所得血浆药物浓度经 3p97 软件进行拟合, TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 在大鼠血浆内的药代动力学符合二室开放模型, 加权为 $1/C^2$, 分布半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 为 (0.049 \pm 0.03) h, 消除半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 为 (0.55 \pm 0.05) h, V 为 (15.43 \pm 3.7) $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$, AUC 为 (8.21 \pm 1.4) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, CL 为 (33.6 \pm 4.5) $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, MRT 为 (0.71 \pm 0.1) h。

5 ELISA 法测定小鼠脑匀浆液中 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 和 haFGF₁₄₋₁₅₄ 含量

5.1 标准曲线 用空白小鼠脑匀浆液作为稀释液, 将 haFGF 进行梯度稀释, 制备标准曲线。所得标准曲线为 $y = 0.0012x + 0.2256$, $R^2 = 0.9954$, 表明在 31.25~2 000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性良好。

5.2 小鼠脑匀浆液中融合蛋白含量检测 将检测结果由浓度单位转换成每千克组织含量, 结果采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。如图 2 所示, TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 组静脉注射后 0.5~2 h 均可以检测到, 并且在 1 h 达到峰值, 比重值为

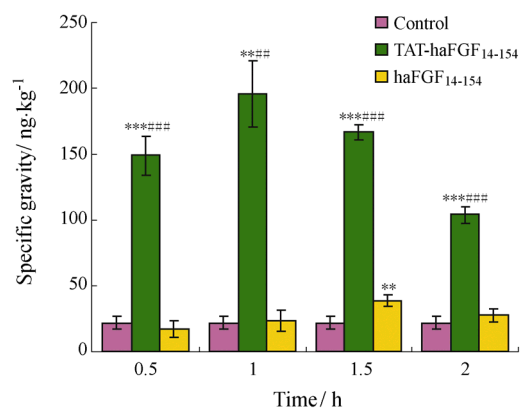


Figure 2 Concentration of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ and haFGF₁₄₋₁₅₄ after 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ iv in mouse brain homogenate ($n = 5$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs haFGF₁₄₋₁₅₄

195.85 ng·kg⁻¹; 而 haFGF₁₄₋₁₅₄ 组仅在 1.5 h 可检测到, 比重值为 38.28 ng·kg⁻¹, 仅占 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 组最高值的 1/5。且两组相比, TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 组的比重值均高于 haFGF₁₄₋₁₅₄ 组。

6 免疫组织化学法检测脑组织中 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 和 haFGF₁₄₋₁₅₄ 的分布

6.1 小鼠脑组织分布

免疫组织化学检测结果显示, 小鼠尾静脉注射 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 后 15 min (图 3A、图 4A) 即可在皮质和海马区检测到极少数褐色颗粒 (如箭头所示, 为阳性结果, 代表融合蛋白在脑组织的分布), 之后的 30~120 min (图 3B~D、图 4B~D) 皮质和海马都可以检测到融合蛋白的存在, 在 60 min 时 (图 3C、图 4C) 达到高峰; 而 haFGF₁₄₋₁₅₄ 在小鼠大脑皮质和海马 60 min 检测不到, 仅在 90 min (图 3F、图 4F) 检测到有少量褐色颗粒。

6.2 大鼠脑组织分布

免疫组织化学结果 (图 5) 显示, 大鼠静脉注射 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 后 120 min, 在皮质和海马都可以检测到融合蛋白 (图 5A 和 5C),

而 haFGF₁₄₋₁₅₄ 静脉注射后 120 min 在大脑皮质和海马区 (图 5B 和 5D) 均有少量褐色颗粒出现, PBS 对照组为阴性结果 (图略)。

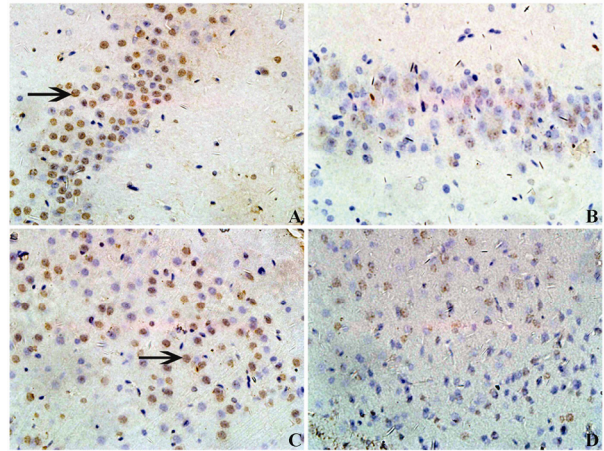


Figure 5 Immunohistochemistry analysis in rat pallium (C and D) and hippocampus (A and B) after intravenous injection of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ (A and C) and haFGF₁₄₋₁₅₄ (B and D) at 120 min. Black arrows indicate the typical positive-stained (magnification, ×400)

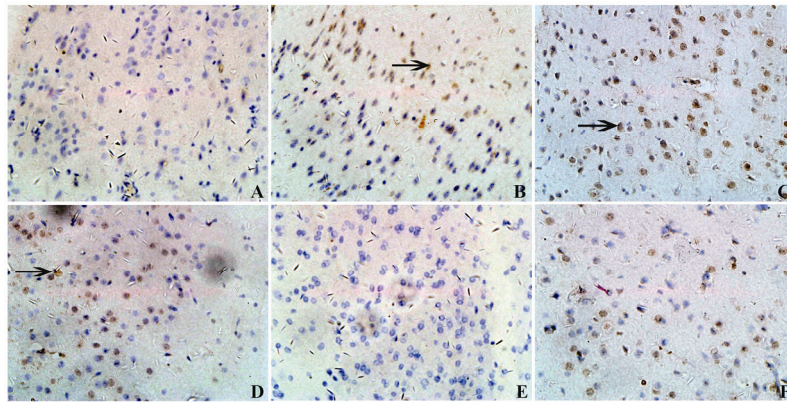


Figure 3 Immunohistochemistry analysis in mice pallium after intravenous injection (iv) of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ and haFGF₁₄₋₁₅₄. Immunohistochemistry was performed 15, 30, 60, and 120 min after iv of the TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ (A-D), the control PBS (E) and 90 min after iv of the haFGF₁₄₋₁₅₄ (F). Black arrows indicate the typical positive-stained (magnification, ×400)

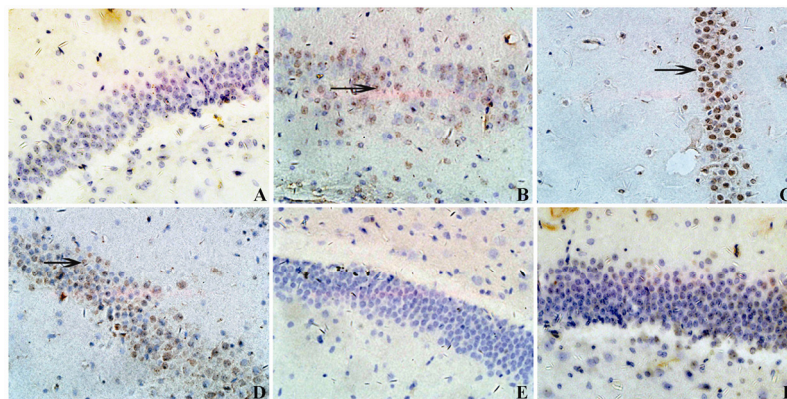


Figure 4 Immunohistochemistry analysis in mice hippocampus after intravenous injection (iv) of TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ and haFGF₁₄₋₁₅₄. Immunohistochemistry was performed 15, 30, 60, and 120 min after iv of the TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ (A-D), the control PBS (E) and 90 min after iv of the haFGF₁₄₋₁₅₄ (F). Black arrows indicate the typical positive-stained (magnification, ×400)

讨论

目前, 生物技术药物的药代动力学研究方法有同位素示踪法、免疫学法、色谱与质谱等^[12]。酶联免疫 (ELISA) 法属于免疫学方法中的一种, 通过回收率和精密度实验可知, ELISA 法灵敏可靠。本研究实验结果表明, TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ (300 μg·kg⁻¹) 经静脉注射, 迅速在体内分布, 且在血浆中消除较快, 3 h 后在血浆中仍然可以检测到。TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 为大分子蛋白质, 低温保存较稳定, 受环境影响 (如温度、pH 值等) 易降解, 导致其半衰期较短。此外, 本实验采用空白大鼠 10 倍血浆稀释液制备标准曲线; 与样品的 10 倍稀释检测保持一致, 减小了实验误差。大鼠和小鼠的免疫组织化学检测结果均显示, TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 经静脉注射后可迅速穿过血脑屏障, 分布于大脑皮层和海马区, 主要定位于细胞核, 与文献^[13]报道一致。这种核定位可能与 TAT-PTD (Gly-Arg-Lys-Lys-Arg) 和 haFGF (Lys-Pro-Lys-Leu) 细胞核的迁移序列有关^[14, 15]。小鼠 ELISA 法和免疫组织化学检测结果较为吻合, 结果均显示: TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 在 1 h 达到高峰, 3 h 后仍可以检测到有阳性结果, 而 haFGF₁₄₋₁₅₄ 仅在 90 min 时有少量分布于脑中。李校堃等^[16]用放射性同位素法检测 ¹²⁵I-rhaFGF 皮肤用药的药代动力学结果也表明, rhaFGF 的组织分布在大脑中最少, 说明 haFGF₁₄₋₁₅₄ 在正常动物大脑内仍有分布。两者对比的结果表明: TAT 可介导 haFGF₁₄₋₁₅₄ 更多更快地穿过大脑未受损的动物血脑屏障。目前, 关于 TAT 转导的跨膜机制尚不明确, 可能与细胞膜表面的多糖以及乙酰肝素之间的静电作用有关^[17]。TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 穿过血脑屏障, 进入大脑, 将为 haFGF₁₄₋₁₅₄ 在脑内更好地发挥由 Aβ 所致神经元毒性的保护作用提供可能性, 为 TAT-haFGF₁₄₋₁₅₄ 成为临床上治疗 AD 的候选药物提供依据。

References

- [1] Wu JC, Huang WC, Tsai YA, et al. Nerve repair using acidic fibroblast growth factor in human cervical spinal cord injury: a preliminary Phase I clinical study [J]. *J Neurosurg Spine*, 2008, 8: 208-214.
- [2] Reuss B, von Bohlenund Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system [J]. *Cell Tissue Res*, 2003, 313: 139-157.
- [3] Maccioni RB, Lavados M, Maccioni CB, et al. Biological markers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1: 307-314.
- [4] Cai B, Lin Y, Xue XH, et al. TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice [J]. *Exp Neurol*, 2011, 227: 224-231.
- [5] Katsura K, Takahashi K, Asoh S, et al. Combination therapy with transductive anti-death FNK protein and FK506 ameliorates brain damage with focal transient ischemia in rat [J]. *J Neurochem*, 2008, 106: 258-270.
- [6] Cao G, Pei W, Ge H, et al. *In vivo* delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis [J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 5423-5431.
- [7] Kilic U, Kilic E, Dietz G, et al. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice [J]. *Stroke*, 2003, 34: 1304-1310.
- [8] Li T, Fan Y, Luo Y, et al. *In vivo* delivery of a XIAP (BIR3-RING) fusion protein containing the protein transduction domain protects against neuronal death induced by seizures [J]. *Exp Neurol*, 2006, 197: 301-308.
- [9] Nagel F, Falkenburger BH, Tonges L, et al. Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2008, 105: 853-864.
- [10] Lin JC, Zhang MJ, Su ZJ, et al. Expression, purification and bioassay of Tat-aFGF fusion protein in *Escherichia coli* [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2010, 30: 11-17.
- [11] Ren J, Qin CG, Xu CL, et al. Development of cell-penetrating peptides as vectors for drug delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 17-25.
- [12] Wang XF, Zheng Q. The methodology and experimental design in pharmacokinetics study of biotechnological drugs [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2004, 24: 80-83.
- [13] Huang TD, Rao YL, Feng CL, et al. High-level expression and purification of Tat-haFGF₁₉₋₁₅₄ [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 77: 1015-1022.
- [14] Lozano RM, Pineda-Lucena A, Gonzalez C, et al. ¹H NMR structural characterization of a nonmitogenic, vasodilatory, ischemia-protector and neuromodulatory acidic fibroblast growth factor [J]. *Biochemistry*, 2000, 39: 4982-4993.
- [15] Wu SP, Fu AL, Wang YX, et al. A novel therapeutic approach to 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats via supplementation of PTD-conjugated tyrosine hydroxylase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346: 1-6.
- [16] Li XK, Xu H, Zhao W, et al. Pharmacokinetic study of recombinant human acidic fibroblast growth factor in rabbits by skin external use [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 424-427.
- [17] Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, et al. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides [J]. *Traffic*, 2007, 8: 848-866.