

维脑康干预大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的蛋白质组学研究

苗 兰¹ 曹 进² 徐 立¹ 孙明谦¹ 刘建勋¹

(1 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京, 100091; 2 中国食品药品检定研究院, 北京, 100050)

摘要 目的:应用 LC-MS/MS 蛋白质组学方法研究维脑康胶囊治疗大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用机制。方法:大鼠分为正常对照组、模型对照组及维脑康胶囊组,取大鼠全血离心获得血清,进行酶解,应用 nano Chip-ESI Ion Trap 进行样本分析,测定结果利用 Agilent Spectral mill、scaffold 及 SIMCA P+ 等软件进行蛋白鉴定、模式判别及蛋白相对定量分析。结果:最终比出正常对照组、模型对照组和维脑康胶囊组的总蛋白数分别为 833 个、701 个和 798 个,与正常对照组相比,模型对照组分析出的差异蛋白共 18 个,其中上调的是 13 个蛋白,下调的是 5 个蛋白,而在维脑康胶囊组中这些差异蛋白的表达均有所恢复,其功能分别与神经元凋亡、神经元生长与分化、信号通路及转录调控等过程密切相关。结论:维脑康胶囊治疗局灶性脑缺血再灌注的作用机制可能与这些差异蛋白有关,为维脑康胶囊作用的分子机制研究提供了新思路。

关键词 维脑康;蛋白质组学;局灶性脑缺血再灌注

Proteomics Study of the Therapeutic Effect of Weinaokang on Rats Undergoing Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

Miao Lan¹, Cao Jin², Xu Li¹, Sun Mingqian¹, Liu Jianxun¹

(1 Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing key Laboratory of pharmacology of Chinese materia medica, Beijing 100091, China; 2 Traditional Chinese Medicine Pharmacology, Beijing Key Laboratory, Beijing 100091, China; 3 National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract **Objective:** To investigate the molecule mechanism of Weinaokang in treatment of the rats with focal cerebral ischemia reperfusion by using LC-MS/MS method. **Methods:** Global proteomics analysis had been conducted on serum samples collected from normal group, model group, and Weinaokang treatment group. After digestion, the samples were detected by applying nano Chip-ESI Ion Trap. Protein identification, pattern discrimination and relative quantitative analysis were determined using Agilent Spectral mill, scaffold 3 and SIMCA P+ software. **Results:** 833, 701 and 798 proteins were found on healthy group, model group, and TCM treatment group respectively. Compared with healthy group, 18 changed proteins had been determined: 13 proteins up-regulated, 5 proteins down-regulated in model group, and these differential proteins had converse tendency in TCM treatment group. Current studies also aim at the major functional classification of proteins between model and health groups, as well as model and treatment groups. The biological function of these changed proteins were closely related to growth and differentiation of neurons, neuronal apoptosis, signal transduction and regulation of translation, etc. **Conclusion:** The molecule mechanism of Weinaokang capsule for treating focal cerebral ischemia reperfusion may be associated with different proteins, and it will provide a new idea for study of molecule mechanism of Weinaokang capsule.

Key Words Weinaokang; Proteomics; Focal cerebral ischemia reperfusion

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.10.003

脑血管病是导致人类死亡的三大疾病之一,在全球范围内,每年使 460 万人死亡,中国也是脑卒中高发地区,据估计居民现患脑血管病 600 万,每年新发生脑血管病 130 万人,死亡近 100 万人,因此,如何有效治疗脑血管病已成为目前关注的热点。中药制剂在治疗脑血管病方面具有独特的优势,维脑康胶囊(WNK)系由人参、银杏叶等中药组成的中药复方,临床研究表明,该药对血管性痴呆(VaD)患者有明显的改善作

用^[1]。前期的实验研究表明 WNK 对化学损伤造成的小鼠获得性、巩固性及再现性记忆障碍均有改善作用^[2],可能通过下调过量的氨基酸释放而起到脑保护作用^[3]。但是,WNK 的作用机制、具体的作用靶点尚不清楚。从蛋白质组学角度对中药的多环节、多靶点调控作用进行研究,可从整体水平揭示中药单方、复方的作用机制,阐明药物作用的物质基础。

本研究中,我们通过对正常、局灶性脑缺血再灌注

模型大鼠及给予 WNK 治疗大鼠进行血清蛋白质提取、分离、鉴定及数据比对,从整体上研究经 WNK 治疗的局灶性脑缺血再灌注模型大鼠特有蛋白质的表达情况,可望从分子水平上探讨 WNK 治疗局灶性脑缺血再灌注的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器:Agilent 6340 Ion Trap (Chip-ESI 源);Agilent 1200 nano-LC (Chip), Agilent chemstation 色谱工作站 (Agilent, USA);METTLER TOLEDO AE240 电子分析天平;注射泵 KDS100CE 购自 KD Scientific 公司;蛋白分析用 Chip C₁₈, 150mm × 75μm (Agilent, USA)。

试剂:三羟甲基氨基甲烷 Tris 购自 amresco, TCEP、胰蛋白酶 Trypsin 均购自 Thermo, 碘代乙酰胺 IAA 购自 sigma 公司, 乙腈、丙酮分别为 fisher、J. T. Braker 公司产品,均为色谱纯,甲酸购自 J. T. Braker 公司,为分析纯,BCA 试剂盒购自百泰克公司,实验用水为娃哈哈纯净水。

1.2 方法

1.2.1 动物血清样品的采集 前期采用线栓法建立局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,并给予中药 WNK 进行治疗,之后采集正常对照组、模型组及 WNK 组大鼠全血,每组各 10 只。每只大鼠采集 2 mL 血液,4℃ 放置 30 min 后,自然凝固,离心 (3500 r/min, 15 min)。取上清转移至 eppendorf 管,离心 (7500 r/min, 30 min),取上清作为血清样品,放入 -80℃ 低温保存。血清应用 Bicinchoninic acid Protein Assays (BCA) 法测定蛋白浓度。

1.2.2 样品的处理 取 50μL 血清与 3 倍体积 50 mmol/L Tris 缓冲液混合,涡旋 1 min,加入 3 倍体积 -20℃ 预冷丙酮,涡旋 1 min,4℃ 沉淀过夜,离心 8000 r/min, 15 min, 4℃,取沉淀,使丙酮挥发完全,但不使样品完全干燥,备用。

1.2.3 蛋白质酶解 混悬蛋白于 50mM tris buffer pH8.5 中,浓度大约 1~3 mg/mL;活化 Trypsin (50 mM 浓度, tris 溶液) 后,以蛋白含量与胰蛋白酶液比例为 20:1 加入酶液,37℃ 水浴 3 h,每 1 小时涡旋 1 次,此为第一次消解;加入 1 mM TCEP,37℃ 水浴 30 min,放冷至室温;进行烷基化,3 μL IAA 溶液对应 10 μg 蛋白,37℃ 水浴 20 min (避光);第二次消解,以蛋白含量与酶液比例为 30:1 加入酶液,37℃ 水浴过夜;终止反应,每 50μL 溶液加入 2 μL 甲酸;离心,12000 r/min, 4℃ 15 min,取上清液分析。

1.2.4 质谱及色谱条件 质谱条件:Scan Mode:Ultra Scan;Source:ESI-Chip;阳离子模式;Capillary:-

1900V;Dry temp:300℃;Dry Gas:3.0 L/min;Skimmer:30V;Cap Exit:100V;Trap Drive:80.0;Smart Target:500000;Accu Time:200ms;MS/MS Frag Amp:1.0V;质量范围:300~2000m/z,离子排除:5 个前体离子;排除时间 30s。

色谱条件:Chip:150mm 300A C₁₈ chip w/160nL trap column;进样量:0.2μL;Pump1 (nano pump) 流动相:A 相为 97% 水和 3% 乙腈溶液加甲酸至 0.1%,B 相为 90% 乙腈和 10% 水加甲酸至 0.1%;流速:0.3 μL/min;线性梯度洗脱时间程序如下:起始 3% B 0-70 min 线性上升到 45%,70-85 min 线性上升到 90%,85-95.01 min 线性上升到 100%,保持 15 min,110-115 min 下降至 3%,持续 10 min;运行时间:125 min。Pump2 (Capillary pump) 流动相:A 相为 0.1% 甲酸水溶液,B 相为 90% 乙腈和 10% 水加甲酸至 0.1%;流速:3 μL/min;线性梯度洗脱时间程序如下:起始 0% B 持续 4 min;4-5 min 线性上升到 80%,持续 5 min,10.01-85 min 维持 80%,流速为 0 μL/min,第 85.01-95 min 线性上升到 100%,流速恢复至 3 μL/min,96 min 降至 0%;运行时间:125 min。

1.2.5 MS/MS 数据搜索 应用 Agilent chemstation 色谱工作站中 DataAnalysis 软件进行图谱分析;应用 Excel2007 及 SPSS 12.0 进行数据的统计学分析。

MS/MS 数据分析应用的是 Agilent Spectrum Mill 软件。参数设置:Database:Swissprot;Species:Rattus norvegicus;Digest:Trypsin;Maximum Missed cleavages:2;Fixed Modification:Carbamidomethylation (C);Precursor mass tolerance:±2.5Da;Product mass tolerance:±0.7;Filter peptides by Score > 6, SPI (scored peak intensity) > 50%;Filter by protein score > 11。

1.2.6 蛋白相对定量和功能聚类 应用 scaffold3.0 软件进行蛋白数据处理、相对定量、蛋白定位和功能的聚类分析。肽段的鉴定要求其可能性在 95% 以上视为可信,而蛋白的鉴定要求其可能性在 99% 以上,同时匹配上的肽段必须有 2 个以上,假阳性率 < 0.01%。相对定量的方法是采用累计谱图计数的方法,即用鉴定的 MS/MS 谱图总数来评价一个特定蛋白的丰度,对不同分组中的这个蛋白所检测到的 MS/MS 谱图总数进行归一化后,再进行相对丰度的比较。在 scaffold 软件中支持多组数据同时处理与统计学计算,本课题分为正常对照组、模型组和 WNK 组,共 3 组,因此统计学方法用的是适用于多组比较的 ANOVA Test 方法, $P < 0.05$ 。在上述参数设置及数据分析方法的前提下,再应用 scaffold3.0 软件中 GO 注释的功能进行蛋白质功

能聚类分析。

2 结果

2.1 大鼠血清整体蛋白的发现 通过应用非标记液相色谱/质谱联用技术进行 WNK 治疗局灶性脑缺血再灌注大鼠作用机制的血清蛋白组研究, 分别设立为正常对照组、模型组和 WNK 组, 结合 Spectrum Mill 和 scaffold 软件的搜索比对和分析, 最终比对出正常、模型和 WNK 组的总蛋白数分别为 833 个, 701 个, 798 个。

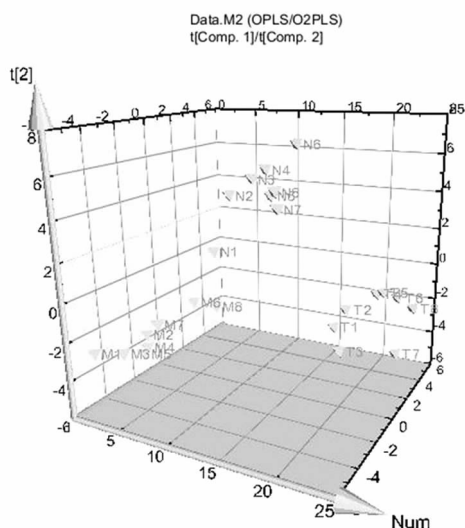


图 1 大鼠血清蛋白组三维 PCA 图

N: 正常对照组; M: 模型组; T: WNK 组

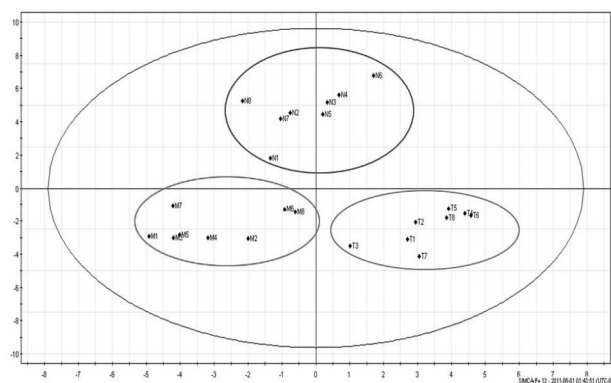


图 2 大鼠血清蛋白组 OPLS-DA 图

N: 正常对照组 (上圈); M: 模型组 (左圈);
T: WNK 组 (右圈)

2.2 大鼠血清蛋白组主成分和偏最小二乘法分析 应用 SIMCA P + 12.0 软件进行蛋白组数据的模式判别和预测, 针对不同的分组进行区别。研究中利用最终搜索出的蛋白进行比较, 以获得的正常对照组特异性蛋白为参照, 对 3 组来源样品进行了 PCA 和 OPLS-DA 分析, 将上述各组进行分类, 各组聚类较好。如图, 在 PCA 图和 OPLS-DA 图中, 结果可看出 3 组样品呈现三角形分布, 且各自聚类较显著, 彼此之间能够得到

较好的区分。

2.3 检出蛋白功能总结 本研究应用 scaffold3.0 中 GO 注释的功能, 针对检测到的蛋白进行了蛋白功能和蛋白定位的聚类分析。如下图, 检测到的蛋白所涉及的生物学过程包括: 应激反应、多细胞生物过程、代谢过程、定位、免疫系统过程、生物调控反应、发育过程、细胞过程等一系列生物学过程。而蛋白的定位大部分分布于细胞膜、线粒体、细胞器膜、胞质、细胞骨架、细胞内细胞器及细胞外区域等。而如图 4, 检测到的蛋白功能主要涉及分子功能、结合功能、分子信号转导活性、酶调控活性及催化活性等。

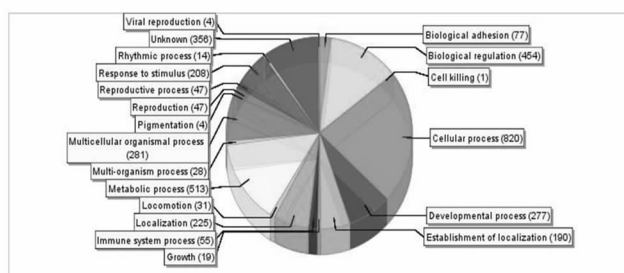


图 3 大鼠血清检出蛋白所涉及的生物学过程

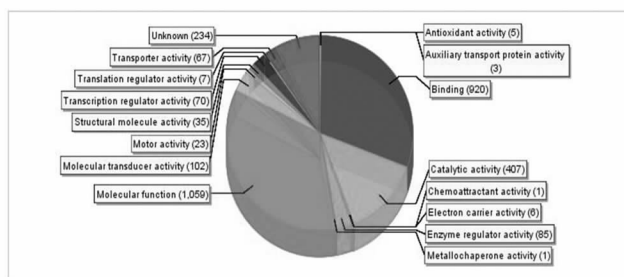


图 4 大鼠血清蛋白组检出蛋白的功能分类

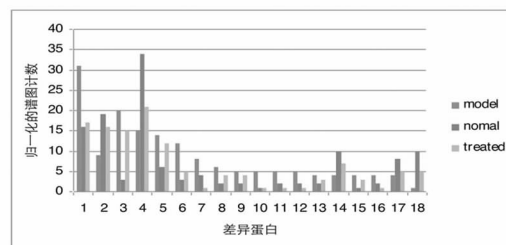


图 5 经定量比较后的差异蛋白

2.4 差异蛋白及其功能分析 对于所检测出的蛋白利用累积计数的方式, 并应用 Scaffold 软件进行了蛋白相对量的比较, 蛋白改变在 2 倍以上视为差异蛋白 (图 5)。分析出的差异蛋白共 18 个 (表 1、2), 其中与正常对照组比较, 模型组中上调的是 13 个蛋白, 下调的是 5 个蛋白, 而在 WNK 组中这些差异蛋白的表达有所恢复, 说明药物可能通过调控这些蛋白而起到了一定的治疗作用。同时这些差异蛋白其功能特性分别与神经元凋亡、神经元生长与分化、信号通路及转录调控等过程密切相关。

表 1 大鼠血清中发现的 18 种主要差异蛋白

序号	ID	分子量	等电点	种属	数据库	分值	蛋白名称
1	Q99PJ2	61605.4	7.26	Mus musculus	SwissProt	10.2	Tripartite motif – containing protein 8
2	P29621	46766.3	7.69	Mus musculus	SwissProt	22.52	Serine protease inhibitor A3C
3	A2CE44	90376.9	7.75	Mus musculus	SwissProt	19.16	Zinc finger X – linked protein
4	Q921I1	76724.3	6.94	Mus musculus	SwissProt	28.92	Serotransferrin
5	Q99246	240139.8	6.45	Mus musculus	SwissProt	26.37	Voltage – dependent L – type calcium channel subunit alpha – 1D
6	Q9D9I4	45825.3	6.47	Mus musculus	SwissProt	8.4	TBC1 domain family member 20
7	Q80YR4	99192.6	8.7	Mus musculus	SwissProt	13.61	Zinc finger protein 598
8	Q6DID5	76069.5	8.75	Mus musculus	SwissProt	9.23	PWWP domain – containing protein MUM1
9	Q8BGT6	94091.8	6.26	Mus musculus	SwissProt	18.81	MICAL – like protein 1
10	Q8BKC8	91515.6	5.91	Mus musculus	SwissProt	13.4	Phosphatidylinositol 4 – kinase beta
11	P11087	138033.1	5.65	Mus musculus	SwissProt	31.6	Collagen alpha – 1(I) chain
12	P25446	37418.1	8.42	Mus musculus	SwissProt	15.34	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
13	P26618	122684	5.03	Mus musculus	SwissProt	17.32	Alpha – type platelet – derived growth factor receptor
14	Q2TPA8	54208.7	6.31	Mus musculus	SwissProt	11.54	Hydroxysteroid dehydrogenase – like protein 2
15	Q4VAC9	148572.8	5.5	Mus musculus	SwissProt	23.74	Pleckstrin homology domain – containing family G member 3
16	P97792	39947.8	6.54	Mus musculus	SwissProt	8.52	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog
17	Q8BSI6	65751.9	5.3	Mus musculus	SwissProt	10.56	R3H and coiled – coil domain – containing protein 1
18	Q8VEG6	63023.7	6.1	Mus musculus	SwissProt	14.63	CCR4 – NOT transcription complex subunit 6 – like

表 2 大鼠血清中发现的 18 种主要差异蛋白的功能

序号	蛋白名称	功能
1	Tripartite motif – containing protein 8	蛋白结合酶
2	Serine protease inhibitor A3C	丝氨酸型蛋白内切酶抑制剂
3	Zinc finger X – linked protein	正向调节核酸结合转录因子活性
4	Serotransferrin	细胞内铁离子转运,调节铁离子平衡
5	Voltage – dependent L – type calcium channel subunit alpha – 1D	G 蛋白信号转导,离子转运
6	TBC1 domain family member 20	细胞膜 Rab GTP 酶活性调节
7	Zinc finger protein 598	结合金属离子蛋白
8	PWWP domain – containing protein MUM1	DNA 修复
9	MICAL – like protein 1	细胞骨架
10	Phosphatidylinositol 4 – kinase beta	高尔基体组成,核苷酸结合转移酶活性
11	Collagen alpha – 1(I) chain	成骨细胞分化,胶原蛋白合成,蛋白传输相关
12	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	肿瘤坏死因子,激活 T 细胞凋亡
13	Alpha – type platelet – derived growth factor receptor	血小板生长因子,正向调节成纤维细胞增值
14	Hydroxysteroid dehydrogenase – like protein 2	代谢过程相关
15	Pleckstrin homology domain – containing family G member 3	Rho 蛋白信号转导调控
16	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	反相调节心肌细胞增值
17	R3H and coiled – coil domain – containing protein 1	核酸结合受体活性相关
18	CCR4 – NOT transcription complex subunit 6 – like	mRNA 过程

3 讨论

本文应用液质联用的蛋白质组学方法,在对 WNK 治疗大鼠局灶性脑缺血再灌注的作用机制进行初步研究中,发现多种蛋白发生了明显的变化,包括神经元凋亡相关蛋白、神经元生长与分化调控蛋白、炎症相关蛋白等。

丝氨酸蛋白酶 (serine proteases) 是一个蛋白超家族,主要通过切割蛋白序列中精氨酸位点来发挥蛋白水解活性,目前研究的这类蛋白主要与凝血和溶栓功能有关^[4]。除了在血液系统中存在,还有定位在中枢

神经系统中的丝氨酸蛋白酶,现在研究较多的就是纤溶酶原激活剂 (t – PA),尿激酶型纤溶酶原激活剂 (u – PA) 及凝血酶 (thrombin)。它们在保持中枢神经系统内稳态的过程中起着关键作用。在生物系统中,丝氨酸蛋白酶的活性依赖于与其抑制剂的动态平衡,这些抑制剂充当着目标蛋白酶的假底物,与其催化位点形成紧密结合,通过减缓细胞外蛋白水解,来改变细胞外基质蛋白水解的过程,包括神经元迁移、成熟的突触连接的形成等^[5]。神经元性丝氨酸蛋白酶抑制剂 (neuroserpin) 在建立正常神经元连接体系中起着重要

的作用,它能够促进轴突和树突的生长^[6]。在脑缺血发生后,体内 neuroserpin 表达量上调可对大脑神经元及缺血损伤区形成保护作用。neuroserpin 表达缺失的局灶性脑缺血中风模型大鼠脑梗死面积及脑损伤程度随着 neuroserpin 的缺失越来越严重,t-PA 活性不断增加,能够引起神经元兴奋性中毒,血脑屏障的破坏,同时诱导小神经胶质细胞活性不断增强,它们又共同促进了前炎症反应的发生和加重;小神经胶质细胞通过对过氧化物、一氧化氮、TNF- α 、谷氨酸盐及金属蛋白酶的释放实现神经毒作用和血脑屏障的破坏,而 t-PA 又进一步促进了这些毒性作用的发生^[7]。老年性痴呆(AD)患者脑内 A β 的异常沉积是神经元变性、丢失的重要原因。A β 在凝集过程中可通过激活小胶质细胞和补体,释放细胞因子和自由基等,诱发炎症反应,促使 tau 蛋白异常磷酸化,导致神经元凋亡和坏死^[8],而有研究表明 neuroserpin 通过与 A β 相互作用,形成复合体,从而使 A β 变成非毒性的低聚物,因而实现了神经元保护作用^[9]。

同源的 Tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) 成员与 TNF 超家族结合可介导多种生物学功能。大部分 TNFRSF 成员及其 TNFSF 配基在大脑或神经系统的不同生理阶段都有表达^[10]。其在大脑中的表达是否保持平衡状态对于多种神经功能是非常重要的,包括促进神经生长、分化、神经支配、促进感受性及树突形成等^[11-12]。一旦 TNFSF/TNFRSF 的功能或表达发生异常,在免疫反应缺失情况下,就会改变大脑的发展、功能及行为,表现为异常^[13]。神经元、神经胶质细胞和少突胶质细胞的 TNFSF/TNFRSF 表达有所改变就会诱导细胞成熟、细胞寿命、形态学和功能发生变化,从而导致神经系统功能的改变^[14]。伴随着神经系统功能的改变,炎症过程如神经炎性和免疫抑制又会进一步促使 TNFSF/TNFRSF 的表达上调,活性改变^[15]。

Zinc finger X-linked protein(ZFX)是具有高度保守序列的锌指转录因子,ZFX 整个蛋白都编码在 X 染色体上,包括酸性转录激活区,核定位序列及具有锌指结构的 DNA 结合区域^[16]。它是胚胎期和成熟期造血干细胞自我更新的转录调控因子,调控人类胚胎干细胞自我更新和分化达到一个平衡状态^[16],有研究报道它与人类的神经胶质瘤、喉鳞状细胞癌、前列腺癌及胃癌疾病过程中的细胞凋亡、细胞增殖及细胞周期有密切的关系,它可以影响 AKT 的激活^[17-18]。在胃癌细胞系中他的表达明显增加,进行基因敲除后可诱导细胞凋亡,增加 Bax 的表达,同时降低 Bcl-2 的表达;阻

止细胞周期的进行,抑制细胞增殖,其机理是通过下调 ERK-MAPK 通路来实现的^[19]。

本研究中,大鼠局灶性脑缺血再灌注模型组血清的蛋白表达轮廓与正常对照组相比,鉴定出 Tripartite motif-containing protein 8、Serine protease inhibitor、Tumor necrosis factor receptor superfamily member 等差异蛋白,而给予 WNK 治疗后,这些差异蛋白呈现与模型组相反的变化趋势,其表达情况与正常对照组较为接近。同时这些差异蛋白的功能特性分别与神经元凋亡、神经元生长与分化、信号通路及转录调控等过程密切相关,这与局灶性脑缺血再灌注发生、发展所涉及的病理过程相吻合,也与前期研究结果显示的 WNK 具有改善认知、脑保护等药理作用的实验结果较吻合。因此,这些差异蛋白可能是 WNK 治疗大鼠局灶性脑缺血再灌注作用的分子机制。本研究为我们今后进行深入研究提供了更多的信息和可能性,奠定了良好的工作基础。

参考文献

- [1] Liu J, Chang D, Chan D, et al. A Randomised Placebo-Controlled Clinical Trial of a Chinese Herbal Medicine for the Treatment of Vascular Dementia. Munich; 2nd International Congress for Complementary Medicine Research[C]. 2007;215.
- [2] 徐立, 丛伟红, 魏翠娥, 等. 维脑康对小鼠记忆障碍的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(6): 60-62.
- [3] 宋文婷, 徐立, 刘建勋. 维脑康胶囊对局灶性脑缺血大鼠脑微透析液中两种氨基酸水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 62-65.
- [4] Olson ST, Gettins PG. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011, 99: 185-240.
- [5] Vivien D, Buisson A. Serine protease inhibitors: novel therapeutic targets for stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(5): 755-64.
- [6] Lee TW, Birch NP. The serine protease inhibitor neuroserpin regulates the growth and maturation of hippocampal neurons through a non-inhibitory mechanism [J]. J Neurochem, 2012, 121(4): 561-74.
- [7] Gelderblom M, Neumann M, Ludewig P, et al. Deficiency in serine protease inhibitor neuroserpin exacerbates ischemic brain injury by increased postischemic inflammation [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63118.
- [8] Standridge J B. Vicious cycles within the neuropathophysiologic mechanisms of Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(2): 95-108.
- [9] Kinghorn KJ, Crowther DC, Sharp LK, et al. Neuroserpin binds A β and is a neuroprotective component of amyloid plaques in Alzheimer disease [J]. J Biol Chem, 2006, 281(39): 29268-77.
- [10] Kodama K, Hokama M, Kawaguchi K, et al. Primary ALK-1-negative anaplastic large cell lymphoma of the brain: case report and review of the literature [J]. Neuropathology, 2009, 29(2): 166-171.
- [11] O'Keeffe GW, Gutierrez H, Pandolfi PP, et al. NGF-promoted axon growth and target innervation requires GITRL-GITR signaling [J]. Nat Neurosci, 2008, 11(2): 135-142.

- 内氨基酸动态变化的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 1023 – 1027.
- [15] Ahmad A, Khan M. M., Raza S. S., et al. Ocimum sanctum attenuates oxidative damage and neurological deficits following focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Neurological Sciences*, 2012, 33(6): 1239 – 1247.
- [16] 林宇, 崔红霞, 赵学梅, 等. 银杏内酯 B 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3): 430 – 431.
- [17] 王远, 王海桃. 银杏叶总黄酮对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国执业药师, 2012, 9(11): 25 – 28.
- [18] Ma S, Yin H, Chen L, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats[J]. *Journal of Natural Medicines*, 2012, 66(1): 25 – 31.
- [19] 王德伟, 朱红. 银杏黄酮磷脂复合物对大鼠脑缺血再灌注后 NO 及 NF- κ B 的影响[J]. 中国西部科技, 2010, 9(165): 40 – 41, 50.
- [20] Yin X. H., Yan J. Z., Hou X. Y., et al. Neuroprotection of S-nitroso-glutathione against ischemic injury by down-regulating Fas S-nitrosylation and downstream signaling[J]. *Neuroscience*, 2013, 248: 290 – 298.
- [21] 张锦, 罗盛, 高尔. 银杏黄酮磷脂复合物对血管内皮保护作用初探[J]. 数理医药学杂志, 2013, 26(2): 201 – 204.
- [22] 葛建彬. 银杏内酯 B(Ginkgolide B) 抑制小鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应及细胞凋亡与 NF- κ B 的关系[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [23] Shah Z. A., Nada S. E., Doré S. Heme oxygenase 1, beneficial role in permanent ischemic stroke and in Ginkgo biloba (EGb 761) neuroprotection[J]. *Neuroscience*, 2011, 180: 248 – 255.
- [24] Saleem S, Zhuang H, Biswal S, et al. Ginkgo Biloba Extract Neuroprotective Action Is Dependent on Heme Oxygenase 1 in Ischemic Reperfusion Brain Injury[J]. *Stroke*, 2008, 39(12): 3389 – 3396.
- [25] Nada S. E., Shah Z. A. Preconditioning with Ginkgo biloba (EGb 761) provides neuroprotection through HO1 and CRMP2[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(1): 180 – 189.
- [26] 王俊杰, 段小毛, 黄煌, 等. 银杏内酯对脑缺血再灌注大鼠线粒体 ATP 敏感性钾通道的影响[J]. 中南药学, 2009, 7(4): 244 – 246.
- [27] 李获梅, 段小毛, 王俊杰, 等. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注大鼠线粒体 ATP 敏感性钾通道的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(7): 1462 – 1463.
- [28] Schwarzkopf T. M., Hagl S, Eckert G. P., et al. Neuroprotection by bilobalide in ischemia; improvement of mitochondrial function[J]. *Pharmazie*, 2013, 68(7): 584 – 589.
- [29] Pundik S, Xu Kui, Sundararajan S. Reperfusion brain injury: Focus on cellular bioenergetics[J]. *Neurology*, 2012, 79(13): 44 – 51.
- [30] Koh P. O. Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates ischemic brain injury – induced reduction in Ca^{2+} sensor protein hippocalcin[J]. *Laboratory Animal Research*, 2012, 28(3): 199 – 204.
- [31] Sung J. H., Shah F. A., Cho E. H. Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents the ischemic brain injury – induced decrease in parvalbumin expression[J]. *Laboratory Animal Research*, 2012, 28(2): 77 – 82.
- [32] Mdzinarishvili A, Sumbria R, Lanq D, et al. Ginkgo Extract EGb761 Confers Neuroprotection by Reduction of Glutamate Release in Ischemic Brain[J]. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2012, 15(1): 94 – 102.
- [33] 王何, 陈红, 杨明秀, 等. 不同脑温状态下银杏叶提取物对大鼠缺血脑组织氨基酸及自由基的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(28): 3530 – 3532, 3534.
- [34] 刘永刚, 李芳君, 王婧, 等. 银杏内酯 B 对大鼠脑缺血/再灌注损伤炎症反应的影响[C]. 2010 年广东省药师周大会论文集, 2010: 326 – 330.
- [35] 常葆凌. 缺血性卒中再灌注损伤的临床认识[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(6): 133.
- [36] 张之南, 杨天楹, 郝玉书. 血液病学(下册)[M]. 北京: 北京卫生出版社, 2003: 1527 – 1534.
- [37] Liu X. J., Zhao G. X., Bao L, et al. Effect of ginkgolide B on atherosclerosis in ApoE-1 – mice[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(1): 81 – 84.
- [38] Yang Z. Z., Li J, Li S. X., et al. Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136(1): 117 – 122.
- [39] 朱磊, 张彦红, 时光, 等. 益脑康对动脉粥样硬化性急性脑缺血大鼠血清 NO、VEGF 及 PDGF-BB 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(8): 2048 – 2051.
- [40] 闫琰, 赵革新, 陈北冬, 等. 银杏内酯 B 抑制血小板 CD40Ligand 表达的分子机制研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 245 – 249.

(2013-09-12 收稿)

(上接第 1141 页)

- [12] Czeschik JC, Hagenacker T, Schäfers M, et al. TNF- α differentially modulates ion channels of nociceptive neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 434(3): 293 – 298.
- [13] Zuliani C, Kleber S, Klusmann S, et al. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1)[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(1): 31 – 40.
- [14] Keohane A, Ryan S, Maloney E, et al. Tumour necrosis factor- α impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells; role of Hes1[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 43(1): 127 – 135.
- [15] Chen J, Buchanan JB, Sparkman NL, et al. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system[J]. *Brain Behav Immun*, 2008, 22(3): 301 – 311.
- [16] Harel S, Tu EY, Weisberg S, et al. ZFX controls the self-renewal of human embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42302.
- [17] Fang J, Yu Z, Lian M, et al. Knockdown of zinc finger protein, X-linked (ZFX) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360(1-2): 301 – 307.
- [18] Jiang H, Zhang L, Liu J, et al. Knockdown of zinc finger protein X-linked inhibits prostate cancer cell proliferation and induces apoptosis by activating caspase-3 and caspase-9[J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(10): 684 – 689.
- [19] Wu S, Lao XY, Sun TT, et al. Knockdown of ZFX inhibits gastric cancer cell growth in vitro and in vivo via downregulating the ERK-MAPK pathway[J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(2): 293 – 300.

(2013-09-12 收稿)