

正常与慢性脑缺血大鼠海马比较蛋白质组学研究

张岗¹, 王发渭¹, 耿淼², 陈利平¹

(解放军总医院 1. 中医科; 2. 老年医学研究所, 北京 100853)

[摘要] 目的:通过研究正常大鼠和慢性脑缺血大鼠海马蛋白质表达的差异,探讨慢性脑缺血后脑损伤的发病机制。方法:采用双侧颈总动脉结扎的方法建立慢性脑缺血模型,20只大鼠随机分为模型组($n=10$)和假手术组($n=10$),4周后对各组大鼠海马进行双向凝胶电泳分析,并通过质谱技术鉴定差异蛋白质。结果:模型组与假手术组相比共有4种蛋白质上调,2种蛋白质下调,经质谱鉴定得到6种蛋白质的具体信息,包括泛素羧基末端水解酶L1;动力蛋白1;雄激素受体辅助活化因子;ATP合酶;rCG50513, isoform CRA_a和expressed sequence AU016693, isoform CRA_b。结论:建立了分辨率较高且重复性较好的慢性脑缺血双向电泳图谱,并发现了6种可能与脑缺血后神经损伤相关的蛋白质。

[关键词] 脑缺血; 海马; 蛋白质组学; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.010

Comparative proteomic analysis of hippocampus between chronic cerebral ischemia rats and normal controls

ZHANG Gang¹, WANG Fawei¹, GENG Miao², CHEN Liping¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine; 2. Institute of Geratology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To explore the pathogenesis of brain damage after chronic cerebral ischemia through analysis of the differences in proteins expression in hippocampus between chronic cerebral ischemia rats and normal rats. **Methods** The chronic cerebral ischemia model was established by ligating the bilateral common carotid arteries. Twenty rats were randomly divided into a model group ($n=10$) and a sham operation group ($n=10$). Four weeks later, the differences of proteins expression in hippocampus between model group and sham operation group were analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and ultraflex TOF/TOF mass spectrograph. **Results** Compared to the sham operation group, the expressions of 4 proteins were up-regulated and that of 2 proteins were down-regulated in the model group. Six proteins were identified by ultraflex TOF/TOF, which were ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; Dynamin-1; TMF regulated nuclear protein-like, partial; ATP synthase; rCG50513, isoform CRA_a; and expressed sequence AU016693, isoform CRA_b. **Conclusion** Well-resolved and reproducible 2-DE patterns of chronic cerebral ischemia rats were established. Six proteins that correlate with nerve damage after chronic cerebral ischemia are identified.

收稿日期 (Date of reception) 2011-02-20

作者简介 (Biography) 张岗, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心脑血管病的研究。

通信作者 (Corresponding author) 王发渭, E-mail: WF301@sina.com

基金项目 (Foundation item) 北京市科委科技计划研发攻关基金 (Z07050700690709)。 This work was supported by the Science and Technology Plan Project of Beijing (Z07050700690709).

Key words: chronic cerebral ischemia; hippocampus; proteomics; rats

缺血性脑血管病是指局部脑组织(包括神经细胞、胶质细胞及联系纤维等)发生供血障碍而变性坏死或一过性功能丧失。它占脑血管病的80%左右,是临床上的常见病、多发病^[1]。目前学者们对脑缺血后脑损害的机制做了广泛的研究,较为肯定的因素有兴奋性氨基酸的毒性作用,胆碱能系统功能障碍,自由基的损伤以及单胺类神经递质的功能失调等^[2-4]。而对脑缺血后脑组织蛋白质表达改变的研究则是近几年来刚刚兴起的热点。由于蛋白质是生命功能的执行者,生命现象的体现者^[5],因此蛋白质组学的发展为我们从分子生物学角度更深入地认识疾病提供了强大的支持。本实验采用双向电泳和质谱分析的方法研究慢性脑缺血模型大鼠海马蛋白质表达的改变,进一步探讨脑缺血后脑损害的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级Wistar大鼠30只,雌雄各半,体质量(200±20)g,解放军总医院实验动物中心提供,许可证号SCXK2006-0009。

1.2 试剂和仪器

IPG预制胶条(pH3-7 17 cm nonlinear)、总蛋白提取试剂盒、碘乙酰胺、甘氨酸、过硫酸铵、两性电解质等试剂购于美国Bio-Rad公司。PROTEAN® IEF Cell电泳仪,PROTEAN® II xi Cell垂直电泳仪为美国Bio-Rad公司产品,Ultraflex TOF/TOF质谱仪为德国Bruker公司产品,JY92-2D超声细胞破碎机为宁波新芝生物科技股份有限公司产品,SUNRISE-BASIC酶标仪为瑞士Tecan公司产品。

1.3 模型制作及分组

根据文献^[6]采用双侧颈总动脉结扎(2-VO)的方法制备慢性脑缺血模型。大鼠用10%的水合氯醛(30 mg/100 g)腹腔麻醉后颈部去毛,常规消毒,行颈正中切口,分离皮下组织至气管,在气管旁找到双侧颈总动脉并结扎。假手术组仅分离双侧颈总动脉不结扎。术后2组大鼠常规饮食饮水。去除死亡大鼠共有20只入选本次实验,随机分为模型组和假手术组,每组各10只。

1.4 组织取材

4周后断头处死大鼠,冰面上迅速取脑,分离出海马后液氮保存备用。

1.5 蛋白质提取及定量

从液氮中取出海马,加入蛋白质提取裂解液后在液氮中反复融冻3次,手工匀浆器匀浆,细胞超声破碎机破碎,低温离心(16 000 r/min, 10 °C, 60 min)后取上清,蛋白质定量采用考马斯亮蓝法测定。

1.6 双向凝胶电泳

参考Bio-Rad双向电泳指南进行,取样品约1 mg,按比例加入水化上样缓冲液,使用17 cm IPG胶条进行一向等点聚焦,聚焦结束后,胶条经过2次平衡,进行SDS-PAGE电泳,等电聚焦参数见表1。

表1 等电聚焦参数
Tab. 1 IEF parameters

步骤	电压/V	模式	时间/h	作用
水化	50	—	12~16	主动水化
S1	250	线性	0.5	除盐
S2	1 000	快速	1	除盐
S3	10 000	线性	5	升压
S4	10 000	快速	6	聚焦
S5	500	快速	任意	保持

1.7 考马斯亮蓝染色

双向电泳结束后,凝胶用MilliQ水漂洗3次,Bio-coomassie stain染色2 h。

1.8 图像分析及质谱鉴定

U-max扫描仪扫描凝胶,图像经Phoretix 2D V2003.02软件分析,找到模型组与假手术组之间的差异蛋白质点(差异点满足条件 $P < 0.05$,差异倍数在3倍以上),切下差异蛋白质点,Ultraflex TOF/TOF质谱仪进行各蛋白质点的质谱检测,得到的数据经Morz,PeakErazor等软件分析校正后生成肽质量指纹谱,在NCBI数据库搜索比对得到差异蛋白质具体信息。

1.9 统计学处理

应用Phoretix 2D V2003.02自带软件对蛋白质灰度值进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能损伤的情况

各组大鼠于造模后约2 h逐渐苏醒,模型组大

鼠精神萎靡,活动减少,饮食减少,生活能力降低,部分大鼠肢体活动障碍,上述症状随着造模后时间的延长而逐渐缓解,假手术组大鼠造模后未出现不良反应。

2.2 双向电泳结果

本次试验所得到的双向凝胶电泳图见图1,共找到6个差异蛋白质点($P < 0.05$),模型组与假手术组相比,4个蛋白质表达上调,2个蛋白质表达下调。

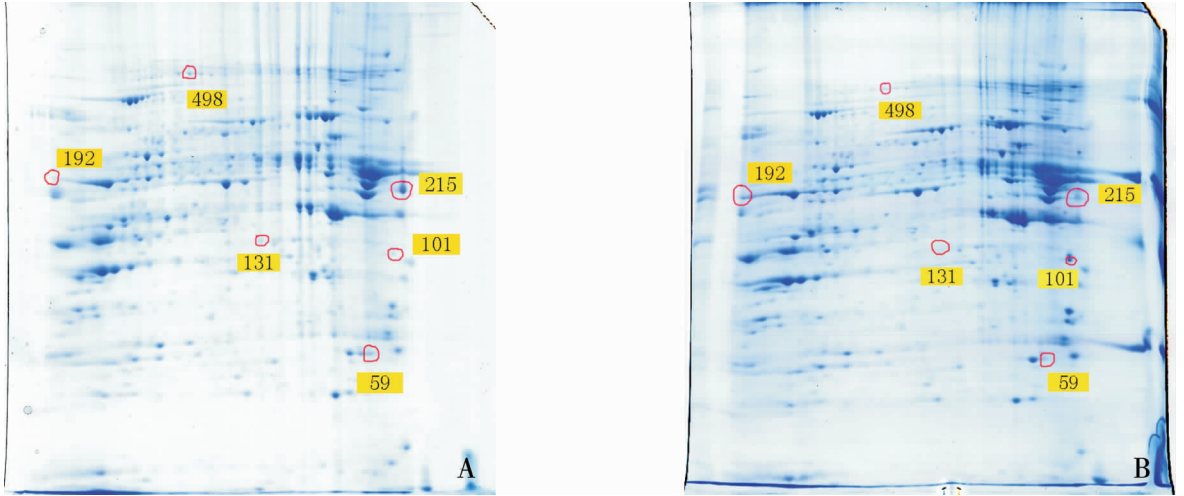


图1 各组大鼠双向电泳图谱。A: 模型组; B: 假手术组。数字所示为6个差异蛋白质点。

Fig. 1 Two dimensional polyacrylamide gel electrophogram of different groups. A: Model group; B: Sham operation group. Six differential expression protein spots are labeled with dots.

2.3 差异蛋白质质谱鉴定结果

经质谱鉴定,数据库搜索比对,共得到6种蛋白质信息,包括泛素羧基末端水解酶L1(ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, UCH-L1);动力蛋白-1(Dynamin-1);雄激素受体辅助活化因子(TMf regu-

lated nuclear protein-like, partial); ATP合酶(ATP synthase); rCG50513, isoform CRA_a(未知蛋白)和 expressed sequence AU016693, isoform CRA_b(未知蛋白)。各差异蛋白质的具体信息见表2。部分差异蛋白质肽质量指纹图谱见图2。

表2 差异蛋白质点

Tab. 2 Differential protein spots

Protein numbers	Proteins	Gi numbers	Mass/D	Score/match	Compared with sham operation group
59	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	Gi 149035334	24 678	123/9	↑
498	Dynamin-1	Gi 190358918	97 576	122/21	↑
131	TMF regulated nuclear protein-like, partial	Gi 293347691	19 894	70/7	↑
192	ATP synthase	Gi 149029483	54 632	152/23	↓
101	rCG50513, isoform CRA_a	Gi 149032103	35 977	70/7	↓
215	expressed sequenceAU016693 isoform CRA-b	Gi 26332899	106 580	74/14	↑

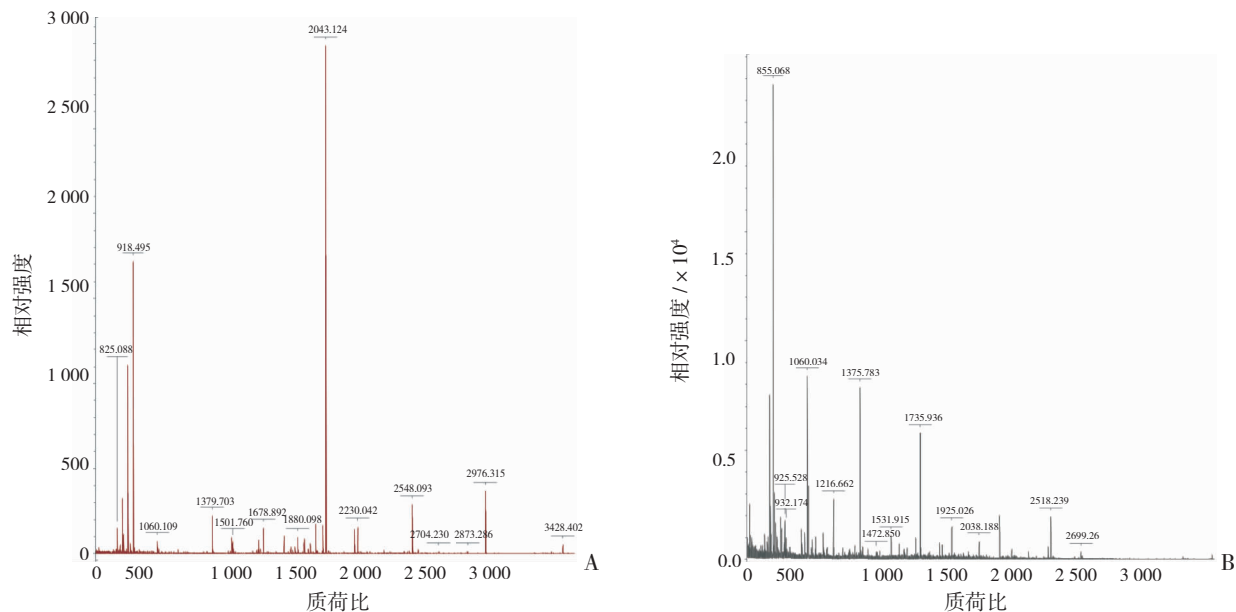


图2 59号和498号蛋白质点肽质量指纹图谱。A:59号; B:498号。

Fig. 2 Peptide mass fingerprint for spot 59 and 498. A: Spot 59; B: Spot 498.

3 讨论

在目前的脑缺血模型中,2-VO具有方法简单,效果确切等优点,是公认的脑缺血造模方法之一。2-VO由de lu Torre于1992年首次提出^[7]。2-VO后大鼠前循环供血减少,后循环的血液经过交通动脉进入前循环,并没有导致任何一个脑区的血流灌注完全停止,接近慢性脑低灌注的发病机制^[8]。范文辉等^[9]报道:2-VO术后2个月大鼠皮层和海马部分神经元固缩,异染色质增多,核仁变小或消失,胞浆致密,散在灶性神经纤维及髓鞘溃变,突触小泡减少,突触后膜肿胀。同时有学者采用激光多普勒血流检测仪测定2-VO后大鼠的脑血流,发现术后脑血流减少,以术后1~2周下降最明显,至16周仍明显低于对照组^[10]。这种全脑低灌注可造成弥漫性的脑损伤,引起神经细胞轴突缺如,海马椎体细胞密度减低^[11]。因此本实验采用2-VO制备大鼠慢性脑缺血模型。

慢性脑缺血是一个动态演变的过程,在这一过程中会产生一系列分子生物学改变,而蛋白质则是这一系列改变的最终执行者。本实验采用双向电泳和质谱分析的方法研究慢性脑缺血模型大鼠海马蛋白质的表达,最终得到6个差异蛋白点,经质谱鉴定得到6种蛋白质的明确信息,其中模型组与假手术组相比表达升高的有UCH-L1, Dynamin-1, TMF regulated nuclear protein-like, partial和expressed se-

quence AU016693 isoform CRA_b,表达降低的有ATP synthase和rCG50513, isoform CRA_a。

泛素-蛋白酶通路(UPS)是体内重要的防御机制,可对抗神经毒性蛋白的聚集,在细胞分裂中的信号转导、转录子调控、DNA修复、应激以及细胞凋亡中起重要作用^[12]。UPS通路主要通过泛素化酶和去泛素化酶对目标蛋白实现精确调控^[13]。而UCH-L1即属于去泛素化酶家族,最初的研究认为UCH-L1只具有单纯的泛素水解酶的活性,可水解泛素与错误折叠蛋白的结合体,形成泛素单体。近年来研究^[14]证实:UCH-L1还具有泛素连接酶的作用。UCH-L1二聚体在不依赖ATP的条件下即可将泛素与底物连接,同时UCH-L1还可以稳定泛素单体,维持泛素的正常浓度。目前许多研究^[15-16]证实:UCH-L1的功能紊乱与神经退行性变的发生密切相关。UCH-L1结构中的甲硫氨酸和半胱氨酸常常是氧化应激的攻击目标。有报道阿尔茨海默病(AD)和帕金森病(PD)患者脑内被氧化修饰的UCH-L1明显高于正常人^[14]。Gong等^[17]亦报道增加AD模型大鼠脑内UCH-L1可提高其学习记忆能力,说明UCH-L1在维持神经系统正常功能中起重要作用。同时在背根神经节细胞质膜中UCH-L1可与磷脂酸结合,从而保护背根神经节细胞,防止其发生脂质过氧化^[18]。而在慢性脑缺血的发病过程中,氧化应激和脂质过氧化是神经细胞受损的重要机制。本实验UCH-L1在模型组高表达,一方面可水解多聚泛素,维持泛素的浓度,增强UPS途径清除错误蛋白的能

力;另一方面也可减轻脑缺血后脑内的氧化应激,提高神经细胞抗脂质过氧化的能力,从而起到代偿性的保护作用。

动力蛋白发现于1963年,主要存在于真核细胞内以及鞭毛和纤毛中^[19];由4个结构域组成:GTP结构域、普列克底物蛋白同源域、GTP效应功能结构域和C末端脯氨酸和精氨酸富集域^[20];在Dynamins的3种亚型中,Dynamins-1在神经细胞中表达最高,作为一种大的GTPase,Dynamins-1在网格蛋白介导的细胞内吞过程中起非常重要的作用。它可以截断突触小泡,使其进入细胞膜,并最终进入突触小泡循环池中以再利用。Dynamins-1对于突触的功能有重要意义,在缺乏Dynamins-1的果蝇中,由于没有有效的突触小泡循环,使得突触不能正常释放各种神经递质^[21]。此外Dynamins-1还与线粒体的分裂增殖及细胞凋亡有关^[22],可能参与了神经退行性变的发病过程。有报道AD的发生与动力蛋白功能减弱, $A\beta$ 和tau蛋白运输出现障碍继而形成聚集体有关^[23]。在AD的发病过程中, $A\beta$ 可诱导海马神经细胞中的Dynamins-1和tau蛋白裂解,引起Dynamins-1水平下降,有毒性的tau蛋白片段增多,从而影响突触小泡的循环和神经系统功能的完整性^[24]。在本实验中,Dynamins-1在模型组中高表达,其原因可能是脑缺血导致突触损伤,正常的功能遭到破坏,诱发机体的保护性反应所致,但其调控机制还需进一步研究。

雄激素是体内重要的类固醇激素,主要包括睾酮和二氢睾酮,它们与雄激素受体结合后在转录水平激活靶基因的表达,从而具有广泛的生理功能,包括促进生殖,维持体内激素水平,刺激蛋白质合成等^[25]。目前大量研究已证实雄激素对脑缺血后的脑损伤具有保护作用,Ramsden等^[26]在红藻氨酸诱导的大鼠惊厥模型中发现,去势组大鼠神经死亡明显多于正常组,补充外源性雄激素后可明显减少神经元死亡数目。雄激素对神经细胞的保护机制可能与该激素调节诱导性一氧化氮合酶的分泌,抑制细胞凋亡,促进胶质细胞分泌神经生长因子有关^[27-29]。本次试验雄激素受体辅助活化因子在模型组中表达增高,与Kerr和Tabori等^[30-31]报道一致。在脑缺血后该蛋白的上调可促进雄激素受体的表达,增强雄激素的生物学效应,提高其神经细胞的保护作用,减轻脑缺血后神经细胞的损伤。

ATP合酶是氧化磷酸化复合体V的重要组成部分。它由位于膜外的 F_1 结构域和膜内的 F_0 结构域组成,在 F_1 和 F_0 之间有中央柄连接^[32]。在细胞氧化磷酸化的过程中,线粒体通过氧化底物产生的跨

膜质子动力势使ATP合酶 F_0 结构域中的c亚基旋转,并使中央柄与之同时转动,产生的转矩力使 F_1 催化结构域的构象发生改变,催化ADP和 P_i 生成并释放ATP^[33]。线粒体ATP合酶在细胞能量代谢中具有重要作用,其功能改变与许多神经退行性变的发生相关。有报道AD神经纤维缠绕中有ATP合酶 α 链的聚集,同时线粒体氧化磷酸化复合体V表达下降;说明ATP合酶功能失调可能参与了AD的发生^[34]。在慢性脑缺血的发病过程中,缺血缺氧可引起脑组织产生大量有毒性的NO,使ATP合酶硝基化,引起其功能受损,并可诱导自由基的产生,最终导致神经细胞死亡^[34]。本实验模型组中ATP合酶的表达明显低于假手术组,与以往报道^[35-36]一致,提示能量代谢障碍是脑缺血后神经功能受损的重要机制之一。

未知蛋白包括rCG50513, isoform CRA_a和expressed sequence AU016693, isoform CRA_b。其中rCG50513, isoform CRA_a在假手术组中高表达,expressed sequence AU016693, isoform CRA_b在模型组中高表达,但其功能均不明确,国内外未见有关报道,与脑缺血损伤的关系还需进一步研究。

总之,脑缺血是一个复杂的病理生理过程,其发病过程中会出现一系列神经毒性和神经保护相互影响和关联的反应。目前多认为脑缺血后脑功能的损害与脑内神经递质及各种酶类的活性改变和神经元细胞凋亡相关。本实验应用了蛋白质组学的技术研究慢性脑缺血大鼠海马蛋白表达的改变,共得到了6种差异蛋白质,这些蛋白质的功能涉及能量代谢、蛋白质降解、激素代谢以及突触囊泡循环、细胞凋亡等多个病理生理过程,提示脑缺血后神经系统功能损害可能与上述蛋白质功能改变有关。本实验所鉴定的蛋白质有助于进一步认识脑缺血损伤的机制,同时也为临床诊断和治疗提供了新的依据和思路。

参考文献:

- [1] 陈斌,陈代梅. 缺血性脑损伤机制的研究进展[J]. 湖北民族学院学报:医学版,2007,24(3):55-57.
CHEN Bin, CHEN Daimei. The research progress of ischemic brain damage mechanism[J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities. Medical Edition, 2007, 24(3): 55-57.
- [2] 王群,高永华,刘海云. 步长倍通对血管性痴呆大鼠脑组织丙二醛、谷氨酸及GSH-Px的影响[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(15): 1472-1473.
WANG Qun, SHANG Yonghua, LIU Haiyun. The effect of

- buchangbeitong on MDA, Glu and GSH-Px in vascular dementia rats brain [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2007, 27(15): 1472-1473.
- [3] 沈瑞乐, 王兴萍, 腾军放, 等. 丁基苯酞对慢性脑缺血大鼠海马 Chat 蛋白表达的影响 [J]. 山东医药, 2008, 48(4): 29-30.
- SHEN Ruile, WANG Xingping, TENG Junfang, et al. The effect of Di-butylphthalide on chat of rats in hippocampus after chronic cerebral ischemia [J]. Shandong Medical Journal, 2008, 48(4): 29-30.
- [4] 郝宪恩, 李楠, 王鑫国. 益气活血复方对多发性梗死性痴呆大鼠大脑皮层神经递质的影响 [J]. 海南医学院学报, 2007, 13(3): 208-210.
- HAO Xianen, LI Nan, WANG Xinguo. Influence of yiqihuoxue complex on neurotransmitter of cerebral cortex in dementia rats of multiple infarction [J]. Journal of Hainan Medical College, 2007, 13(3): 208-210.
- [5] 马学玲, 江新梅, 刘亢丁. 差异蛋白质组学在缺血性脑血管病研究中的应用及进展 [J]. 中国急救医学, 2006, 26(11): 851-852.
- MA Xueling, JIANG Xinmei, LIU Kangding. Application and progress of differential proteome study in ischemic cerebrovascular disease [J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2006, 26(11): 851-852.
- [6] Olsson Y, Brun A, Englund E. Fundamental pathological lesions in vascular dementia [J]. Acta Neurol Scand Suppl, 1996, 168: 31-38.
- [7] de la Torre J C, Fortin T, Park G A, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats [J]. Brain Res, 1992, 582(2): 186-195.
- [8] 常明则, 王新来, 吴海琴. 慢性脑缺血痴呆大鼠额叶细胞凋亡的研究 [J]. 疑难病杂志, 2008, 7(11): 648-650.
- CHANG Mingze, WANG Xinlai, WU Haiqin. Neural apoptosis in frontal lobe of vascular dementia rats induced by chronic cerebral ischemia [J]. Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases, 2008, 7(11): 648-650.
- [9] 范文辉, 李露斯, 刘之荣. 血管性痴呆的动物模型, 神经病理及胆碱能机制 [J]. 中国临床康复, 2002, 6(21): 3172-3173.
- FAN Wenhui, LI Lusi, LIU Zhirong. An animal model of vascular dementia, its pathological basis and cholinergic mechanism [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2002, 6(21): 3172-3173.
- [10] 王守春, 张昱, 常明, 等. 慢性脑缺血痴呆大鼠神经细胞凋亡的研究 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(25): 3412-3413.
- WANG Shouchun, ZHANG Yu, CHANG Ming, et al. Study on neural apoptosis in chronic ischemia-induced vascular dementia rats [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2003, 7(25): 3412-3413.
- [11] 刘汇波, 叶翠飞, 李斌, 等. 双侧颈总动脉结扎对大鼠学习记忆功能和海马组织形态学的影响 [J]. 基础医学与临床, 1998, 18(4): 54-58.
- LIU HuiBo, YE Cuifei, LI Bin, et al. Influence of permanent occlusion of bilateral common carotid arteries on learning and memory ability and hippocampal histomorphology in rats [J]. Basic Medical Sciences and Clinics, 1998, 18(4): 54-58.
- [12] Xue S, Jia P J. Genetic association between Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase-L1 gene S18Y polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Chinese Han population [J]. Brain Res, 2006, 1087(1): 28-32.
- [13] 刘媛, 张志刚. 泛素羧基末端水解酶-1 的研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(6): 544-549.
- LIU Yuan, ZHANG Zhigang. Progression of ubiquitin COOH-term in ahydrolase-L1 [J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2008, 28(6): 544-549.
- [14] Setsute R, Wada K. The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases [J]. Neurochem Int, 2007, 51(2-4): 105-111.
- [15] Chiara Z, Elena C. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease [J]. Prog in Neurobiol, 2007, 81: 294-330.
- [16] 段强, 席学礼, 樊继军, 等. 泛素羧基末端水解酶-1 与神经退行性疾病 [J]. 现代预防医学, 2010, 37(17): 3374-3375.
- DUAN Qiang, XI Xueli, FAN Jijun, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-1 and neurodegenerative disease [J]. Modern Preventive Medicine, 2010, 37(17): 3374-3375.
- [17] Gong B, Cao Z, Zheng P, et al. Ubiquitin hydrolase Uch-L1 rescues beta amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory [J]. Cell, 2006, 126(4): 775-788.
- [18] Naqamine S, Kabuta T, Furuta A, et al. Deficiency of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) leads to vulnerability to lipid peroxidation [J]. Neurochem Int, 2010, 57(2): 102-105.
- [19] 韩英荣, 柳辉, 展永, 等. 纳米机器-分子马达 [J]. 生物学通报, 2010, 45(1): 6-9.
- HAN Yingrong, LIU Hui, ZHAN Yong, et al. Millimicron machine-molecular motor [J]. Bulletin of Biology, 2010, 45(1): 6-9.
- [20] Lee S, Jung K Y, Park J, et al. Synthesis of potent chemical inhibitors of dynamin GTPase [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(16): 4858-4864.
- [21] Xu Q, Li M D. Nicotine modulates expression of dynamin 1 in rat brain and SH-SY5Y cells [J]. Neurosci Lett, 2011, 489(3): 168-171.
- [22] Sas K, Párdutz A, Toldi J, et al. Dementia, stroke and migraine - Some common pathological mechanisms [J]. J Neurol Sci, 2010, 299(1/2): 55-65.
- [23] 刘训言, 孙涛, 周天华. 细胞质动力蛋白与神经退行性疾病的关系 [J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(1): 51-57.
- LIU Xunyan, SUN Tao, ZHOU Tianhua. The relationship of cytoplasmic dynein and neurodegenerative disease [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2009, 31(1): 51-57.
- [24] Sinjoanu R C, Kleinschmidt S, Bitner R S, et al. The novel calpain inhibitor A-705253 potently inhibits oligomeric beta-

- amyloid-induced dynamin 1 and tau cleavage in hippocampal neurons[J]. *Neurochemistry International*, 2008, 53(3/4): 79-88.
- [25] Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action[J]. *Maturitas*, 2009, 63(2): 142-148.
- [26] Ramsden M, Shin T M, Pike C J. Androgens modulate neuronal vulnerability to kainate lesion[J]. *Neuroscience*, 2003, 122(3): 573-578.
- [27] 王晓武, 张卫达, 王晓莉, 等. 雄激素对大鼠脑缺血/再灌注损伤后脑内顶叶皮层 eNOS 及 iNOS 表达的影响[J]. *心脏杂志*, 2008, 20(5): 556-558.
WANG Xiaowu, ZHANG Weida, WANG Xiaoli, et al. Effect of testosterone on expression of ENOS, Inos after focal cerebral ischemic reperfusion injury in rats[J]. *Chinese Heart Journal*, 2008, 20(5): 556-558.
- [28] 李占魁, 冯晋兴, 柯华, 等. 雄激素对缺血缺氧性脑损伤新生鼠脑组织 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *中国新生儿科杂志*, 2008, 23(1): 35-38.
LI Zhankui, FENG Jinxing, KE Hua, et al. Effect of androgen on expression of Bcl-2 and Bax in brain tissue of neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage[J]. *Chinese Journal of Neonatology*, 2008, 23(1): 35-38.
- [29] 李占魁, 赵春艳, 冯晋兴, 等. 丙酸睾酮预处理对 HIBD 新生鼠脑组织神经生长因子表达的影响[J]. *中国儿童保健杂志*, 2008, 16(2): 181-184.
LI Zhankui, ZHAO Chunyan, FENG Jinxing, et al. Study on protective effect and its mechanism of pretreatment of testosterone propionate on hypoxic ischemic brain damage in the neonatal rats[J]. *Chinese Journal of Child Health Care*, 2008, 16(2): 181-184.
- [30] Kerr J E, Allore R J, Beck S G, et al. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor(AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus[J]. *Endocrinology*, 1995, 136(8): 3213-3221.
- [31] Tabori N E, Stewart L S, Znamensky V, et al. Ultrastructural evidence that androgen receptors are located at extranuclear sites in the rat hippocampal formation[J]. *Neuroscience*, 2005, 130(1): 151-163.
- [32] 杜艳, 高峰. 细胞表面 ATP 合酶的研究进展[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2009, 29(6): 741-743, 761.
DU Yan, GAO Feng. Research advances in cell surface ATP synthase[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University. Medical Science*, 2009, 29(6): 741-743, 761.
- [33] Wittig T, Meyer B, Heide H, et al. Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(6/7): 1004-1011.
- [34] Sultana R, Poon H F, Cai J, et al. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(1): 76-87.
- [35] 曾凡新, 董志, 周岐新. 果糖二磷酸钠镁保护缺血性脑损伤的作用机制[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(19): 3798-3799.
ZENG Fanxin, DONG Zhi, ZHOU Qixin. Protective mechanism of sodium magnesium fructose diphosphate on cerebral ischemia[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2004, 8(19): 3798-3799.
- [36] 孙蓉, 吕丽莉, 刘国卿. 芍药苷对沙土鼠不全性脑缺血后能量代谢、NO 和 NOS 的影响[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(10): 832-835.
SUN Rong, LÜ Lili, LIU Guoqing. Effects of paeoniflorin on cerebral energy metabolism, nitric oxide and nitric oxide synthase after cerebral ischemia in mongolian gerbils[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(10): 832-835.

(本文编辑 彭敏宁)