

沉默 Nogo-A 对脂多糖诱导的 PC12 细胞 TNF- α 、IL-6 分泌及 TH 下调的影响

钟建斌¹, 范胜诺², 肖颂华², 万利梅¹, 陈炽邦¹, 钟思敏¹, 刘璐¹, 刘军^{2*}

(1.增城市人民医院//中山大学附属博济医院神经内科,广东广州 511300;2.中山大学孙逸仙纪念医院神经内科,广东广州 510120)

摘要:【目的】构建髓磷脂相关抑制物 A(Nogo-A)基因 shRNA 表达质粒,探讨沉默 Nogo-A 对脂多糖(LPS)诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞)释放炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的调节作用,以及对 PC12 细胞表达酪氨酸羟化酶(TH)的影响。【方法】构建 Nogo-A 基因 shRNA 表达质粒,荧光定量 PCR 法、Western Bolt 法检测细胞中 Nogo-A 蛋白及 mRNA 的表达;用不同浓度 LPS 处理 PC12 细胞 24 h, CCK8 法检测细胞活力,选取合适浓度 LPS 做后续试验;将 PC12 细胞分为对照组、pGenesil-1.1+LPS 组以及 pGenesil-nogoA-shRNA+LPS 组,各组细胞相应处理 24 h 后,用 ELISA 法检测各组上清液中的 TNF- α 和 IL-6 的含量,Western blot 检测 TH 的表达。【结果】构建出 Nogo-A 基因 shRNA 表达质粒,pGenesil-nogoA-shRNA 组 PC12 细胞的 mRNA 及蛋白水平均下调,具有明显的统计学差异($P < 0.05$);随着 LPS 浓度的增加,PC12 细胞的活力逐渐下降;与对照组比,LPS 组上清液中 TNF- α 和 IL-6 的含量明显增多,TH 的表达明显降低;而与 LPS 对照组比较,pGenesil-nogoA-shRNA+LPS 组的上清液中 TNF- α 和 IL-6 的含量明显减少,TH 的表达明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】LPS 可激活 PC12 细胞分泌炎症因子及降低 TH 表达,沉默 Nogo-A 基因对此现象有调节作用。

关键词: 髓磷脂相关抑制物 A;PC12 细胞;shRNA;脂多糖;肿瘤坏死因子- α ;白介素-6;酪氨酸羟化酶

中图分类号:Q7

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2015)03-0391-05

Effect of Silencing Nogo-A on Secretion of TNF- α , IL-6 and Downregulation of TH in PC12 Cells Induced by Lipopolysaccharide

ZHONG Jian-bin¹, FAN Sheng-nuo², XIAO Song-hua², WAN Li-mei³, CHEN Chi-bang³, ZHONG Si-min³, LIU Lu³, LIU Jun^{2*}

(1.Department of Neurology, Zengchen People's Hospital//Boji Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 511300, China; 2. Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangdong 510120, China)

Corresponding to: ZHONG Si-min, E-mail: docliujun@126.com

Abstract: 【Objective】To construct the small hairpin RNA(shRNA) expression plasmid targeting myelin associated inhibitor A(Nogo-A) and study the effect of Nogo-A gene shRNA on lipopolysaccharide (LPS) induced the release of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin -6 (IL-6) in PC12 cells, and the expression of tyrosine hydroxylase (TH). 【Methods】Nogo-A gene shRNA plasmid was constructed. Fluorescence Quantitative Real-Time PCR and Western blot were used to detect the expression of Nogo-A. PC12 cells were treated with different concentration of LPS for 24 hours and detected with cell viability assay CCK8. An appropriate concentration of LPS was chosen for the following experiment. PC12 cells were divided into control group, pGenesil-1.1+LPS group and pGenesil-nogoA-shRNA+LPS group. The content of the supernatant TNF- α and IL-6 of each group was determined by ELISA assay. Western blot was used for detection of TH. 【Results】shRNA expression plasmid

收稿日期:2015-02-10

基金项目:广东省自然科学基金(S2012010010242)

作者单位:钟建斌,副主任医师,研究方向:脑血管病及帕金森病,E-mail: zjbrmyy@126.com; * 通信作者: 刘军,教授,博士生导师,研究方向:认知功能障碍、放射性脑病及脑血管病,E-mail: docliujun@126.com

targeting Nogo-A was successfully constructed. Both mRNA and protein level of Nogo-A in pGenesil-nogoA-shRNA group were decreased, the difference is statistically significant ($P < 0.05$). The viability of PC12 cells decreased when LPS concentration increased. Compared with the control group, the content of TNF- α and IL-6 in the supernatant of LPS group was increased, while the TH level decreased. Compared with the LPS group, the content of TNF- α and IL-6 in the supernatant of pGenesil-nogoA-shRNA+LPS group decreased significantly, while the TH level increased, the difference of both comparisons were statistically significant ($P < 0.05$). 【Conclusion】 LPS induced PC12 cells to release inflammatory cytokines and lower the TH expression, while these effects can be regulated by silencing of the Nogo-A gene.

Key words: myelin associated inhibitor A; PC12 cell; mall hairpin RNA; lipopolysaccharides; tumor necrosis factor; interleukin -6; tyrosine hydroxylase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(3):391-395;402]

髓磷脂相关抑制物(neurite outgrowth inhibitory, Nogo)是一类髓鞘源性蛋白,表达于少突胶质细胞和广泛神经元,与抑制中枢神经轴突生长相关。Nogo分Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C,其中Nogo-A与神经再生的抑制最为相关。研究表明,Nogo-A这种抑制作用与参与NgR的信号转导,作用于RhoA有关^[1]。使用Nogo-A的单克隆抗体及下调Nogo-A基因表达均能部分抵消对神经突起再生的抑制作用,促使受损的神经再生,并使神经功能得到部分恢复。Nogo-A抑制轴突生长还与激活神经元分泌炎症因子有关^[2]。帕金森病(Parkinson's disease, PD)作为一种常见的神经系统变性疾病,已被证实Nogo-A参与其中。而炎症因子如TNF- α 和IL-6参与PD的发生、发展也发挥着重要作用,但是Nogo-A是否调控炎症因子的产生而参与PD,目前仍不得而知。本研究拟采用脂多糖诱导PC12细胞建立PD细胞模型,并使用RNA干扰技术沉默Nogo-A基因,以初步探讨上述模型中炎症因子TNF- α 、IL-6的分泌情况以及酪氨酸羟化酶的表达变化,旨在为PD的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞及主要试剂:PC12细胞株由中山大学孙逸仙纪念医院刘军教授课题组提供;脂多糖(LPS)、二甲基亚砷(DMSO)购自Sigma公司;CCK-8购自日本同仁公司;胰蛋白酶、DMEM、胎牛血清、青链霉素均购自Gibco公司;Silencer TM siRNA Construction Kit购于Ambion公司,质粒购于吉玛公司,Lipofectamine2000转染试剂购Invitrogen公司,TRIzol、SYBR Prime Script Real

Time Q-PCR kit购于TAKARA公司;抗Nogo-A抗体购于美国Santa Cruz公司,抗Tyrosine Hydroxylase抗体、ECL发光液购于Merck Millipore;TNF- α 、IL-6的ELISA试剂盒购自上海酶联生物;其余均为国产分析纯试剂。

主要仪器:包括美国Thermo公司恒温CO₂培养箱,Spectramax M5多功能酶标仪,RT Q-PCR、Western blot采用Bio-Rad仪器,GeenTools曝光系统。

1.2 Nogo-A shRNA表达载体的构建及转染PC12细胞

从Genebank查找nogo-A的mRNA基因序列(基因注册号NM—031831.1),遵循siRNA设计原则设计shRNA序列,从起始密码子后3 075 bp寻找nogo-A基因,选择其中AA+N19+UU序列,将符合要求19个bp序列在NCBI database通过blast搜索核苷酸序列同源性,以保证所靶向的目的基因是唯一,根据以上原则确定本研究所用shRNA。Non-silencing shRNA设计为不与大鼠基因序列具有同源性的19 bp双链RNA。shRNA正义链:5'-AAAUCAGAUGAAGGCCACCCAUUTT-3',反义链:5'-AAUGGGUGGCCUUCAUCUGAUU-3',Non-silencing shRNA正义链:5'-AAAUGACUCAUUGGCGCCUCGUUTT-3',反义链:5'-AACGAGGCGCCAAUGAGUCAUUUTT-3',将合成的片段插入pGenesil-1.1,构建pGenesil-nogoA-shRNA,以pGenesil-1.1作空载体组,普通培养PC12细胞作对照组,采用脂质体Lipofectamine2000,参照使用说明,转染PC12细胞,培养48 h。

1.3 RT Q-PCR及Western blot检测Nogo-A表达

Nogo-A引物设计与合成:设计并合成nogo-A和 β -actin的引物。Nogo-A上游引物:5'-CCTGC

TCTCGGTGACTATCA-3';nogoA 下游引物:5'-GTAAACACCCACATCAACACT-3'; β -actin 上游引物:5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3', β -actin 下游引物:5'-TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG-3',提取以上三组总 RNA,用逆转录试剂盒进行逆转录反应合成扩增 cDNA,分别用 Nogo-A 和 β -actin 引物于 Bio-Rad Q-PCR 仪进行反应,得出 Nogo-A/ β -actin 相对表达值。

Western blot 检测 Nogo-A 蛋白表达:采用细胞总蛋白提取试剂盒提取以上三组细胞总蛋白。蛋白经 10% 和 5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳转印至硝酸纤维素膜,10% 脱脂奶粉封闭。加入兔抗大鼠 Nogo-A 一抗(稀释比 1:1 000),4℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(稀释比例 1:5 000),室温 1 h,加入 ECL 发光液,暗室发光并照相。采用 Image J 图像分析软件对蛋白电泳条带灰度值进行定量分析。

1.4 LPS 诱导 PC12 细胞损伤模型的建立

取对数生长的 PC12 细胞以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板,使用不同浓度 LPS (0.01 ~ 100 nmol/L) 对细胞进行干预,培养 24 h 后每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂后继续培养箱内温育 1 h,用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔的吸光度,计算细胞活力,并明确最佳细胞损伤浓度。

1.5 ELISA 检测上清液中 TNF- α 、IL-6 的含量

取步骤 2.3 实验结果,以最佳 LPS 浓度干预对照组、pGenesil-nogoA-shRNA 组及 pGenesil-1.1 组 24 h,对各组上清液采用常规双抗体夹心 ELISA 法测定,在酶标仪 450 nm 处读取吸光值,并根据标准曲线计算细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 的水平,具体步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.6 Western blot 检测 TH 的表达

取步骤 2.3 实验结果,以最佳 LPS 浓度干预对照组、pGenesil-nogoA-shRNA 组及 pGenesil-1.1 组 24 h,对各组细胞提取总蛋白进行蛋白质印迹实验,操作步骤同前述。

1.7 统计学分析

全部实验数据采用 SPSS17.0 统计软件处理,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方法采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PC12 细胞经 Nogo-A 沉默后 Nogo-A mRNA 表达及 Nogo-A 蛋白的变化

RT Q-PCR 结果显示,对照组与空载体组比较,Nogo-A mRNA 表达差异不显著($P > 0.05$),而 pGenesil-nogoA-shRNA 组中 Nogo-A mRNA 表达明显低于对照组与空载体组。Western blot 检测结果显示,与对照组及空载体比较,shRNA 后 48 h 的 Nogo-A 蛋白明显减少,有明显的统计学差异, $P < 0.05$ (图 1、2)。

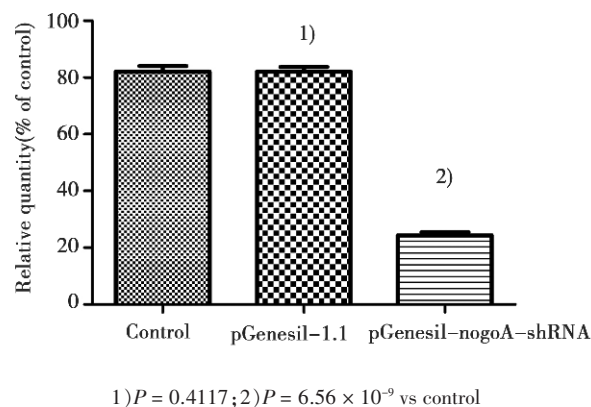


图1 荧光定量 PCR 检测 Nogo-A mRNA 水平
Fig.1 Nogo-A mRNA level detected by SYBR Q-PCR

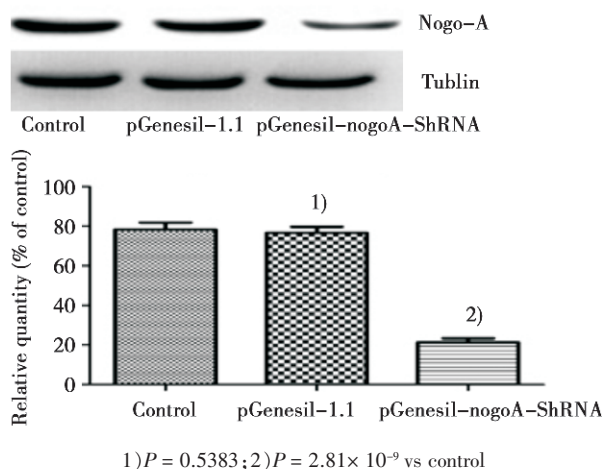
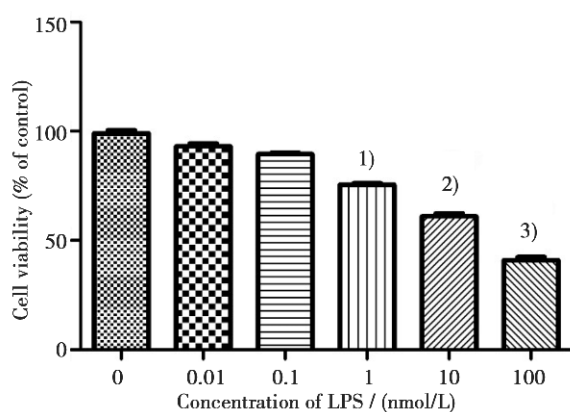


图2 Western blot 检测 Nogo-A 蛋白表达量
Fig.2 Protein level of Nogo-A by Western blot

2.2 细胞活力测定

CCK8 结果显示,随着 LPS 浓度逐渐升高(0.01 ~ 100 nmol/L),作用于 PC12 细胞 24 h 后,

细胞活力呈现逐渐降低($P < 0.05$),并在 1 nmol/L 时得到较理想数值(76.0 ± 2.1)%,此浓度作为后续实验工作浓度(图 3)。



1) $P = 0.0061$; 2) $P = 6.43 \times 10^{-6}$; 3) $P = 4.69 \times 10^{-6}$ vs 0 nmol/L

图 3 不同浓度 LPS 作用 24 h 对 PC12 细胞活力的影响

Fig.3 The cell viability of PC12 cells in different concentration of LPS for 24 h

2.3 ELISA 检测上清液中 TNF- α 、IL-6 的含量

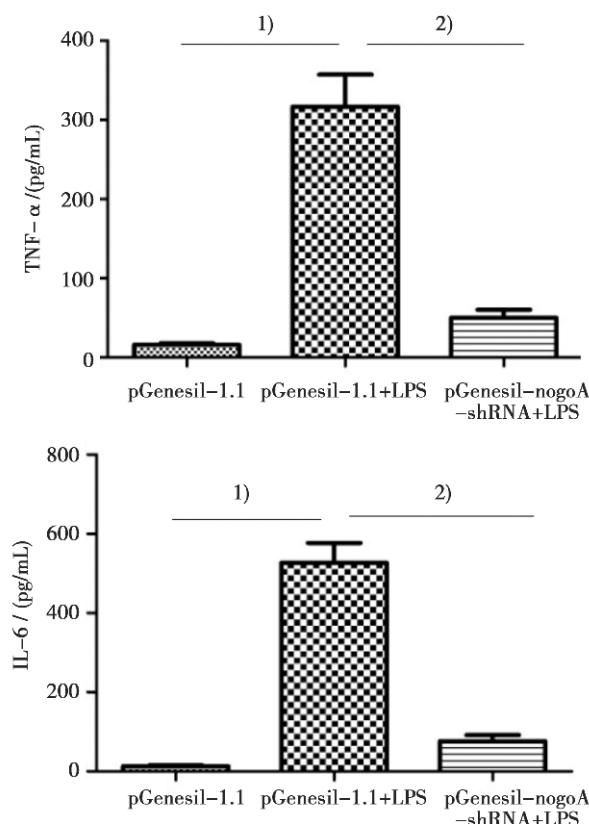
以浓度为 1 nmol/L 的 LPS 为工作浓度,设对照组(普通 PC12 细胞组)、pGenesil-1.1+LPS 组、pGenesil-nogoA-shRNA+LPS 组,处理 24 h 后,各组 ELISA 法测定,在酶标仪 450 nm 处读取吸光值,并根据标准曲线计算标准值,取 3 次实验结果平均值($P < 0.05$),得到结果如图 4。

2.4 Western blot 检测 TH、Nogo-A 的表达

以浓度为 1 nmol/L 的 LPS 为工作浓度,设对照组(普通 PC12 细胞组)、pGenesil-1.1+LPS 组、pGenesil-nogoA-shRNA+LPS 组,处理 24 h 后对各组细胞提取总蛋白进行蛋白质印迹实验,结果如图 5。

3 讨论

目前研究已证实的神经轴突再生抑制因子包括可溶性髓磷脂相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)、少突细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp)和 Nogo 蛋白三种^[3]。Nogo 有三种同源异构体:Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C。其中 Nogo-A 因具有很强的轴突生长抑制作用而倍其中 Nogo-66 是通过与其受体 NgR 结合,转到至 p75/RhoA/ROCK 激活 cAMP 引起细胞内信号传递,进而起神经生长抑制作用。



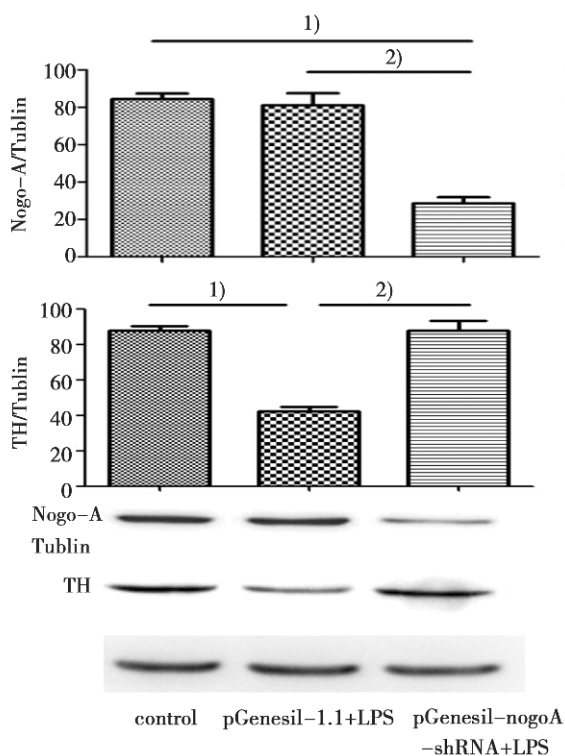
A; 1) $P = 2.68 \times 10^{-23}$; 2) $P = 3.38 \times 10^{-25}$; B; 1) $P = 1.14 \times 10^{-36}$; 2) $P = 1.13 \times 10^{-34}$. Data are represented as $\bar{x} \pm s$

图 4 ELISA 检测各组上清液中 TNF- α (A)、IL-6 (B) 的含量

Fig.4 Levels of TNF- α (A) and IL-6 (B) in the supernatant fluid of different groups

Nogo-A 主要分布于少突胶质细胞,另外在神经元内也高度表达。闵嵘等^[4]发现 Nogo-A 和 Nogo 受体在大脑皮层、海马、下丘脑、苍白球、尾壳核和黑质等处的神经元细胞核中有较强的表达。Nogo-A 在小鼠脊髓灰质前角的运动神经元阳性密度也非常高^[5]。Nogo-A 的这种分布特点决定了其异常表达时在神经系统疾病如脑脊髓外伤、中风、神经变性疾病中的发生、发展起着重要作用^[6-7]。PD 作为一种常见的神经系统变性疾病,与多巴胺能神经元的丢失及再生抑制相关,已有研究证实 Nogo-A 也参与其中^[8-10]。

因此,Nogo-A 作为上述神经系统疾病发生发展的一个关键因素,可作为诸多疾病,尤其是 PD 潜在的治疗靶点。Chen 等^[11]发现,使用 Nogo-A 蛋白的特异性抗体 IN-1 可阻断其神经突抑制活性,GrandPré 等^[12]使用 NgR 的拮抗剂后发现神经轴突



Nogo-A: 1) $P = 2.96 \times 10^{-14}$; 2) $P = 3.34 \times 10^{-14}$; TH: 1) $P = 9.86 \times 10^{-13}$; 2) $P = 4.66 \times 10^{-13}$.

图5 TH、Nogo-A 在各组中的 western blot 表达情况
Fig.5 TH, Nogo-A level of different groups by Western blot

可得到再生。Yang 等^[13]发现沉默 Nogo-A 可促进脱髓鞘疾病的复原。Wang 等^[14]发现, Nogo-A 抑制轴突生长与 Wnt 通路以及 c-Jun、c-Myc 密切相关。还有学者认为, Nogo-A 也参与神经细胞分化、凋亡、自由基生成等等^[15-16]。令我们感兴趣的是, Nogo-A 的神经抑制作用与炎症物质有关。TH 作为负责催化氨基酸 L-酪氨酸转变为二羟基苯丙氨酸的酶, 在多巴胺的合成中起着决定性作用, 表达不足时导致多巴胺合成减少而最终可导致 PD 的发生, 已经作为 PD 的公认指标被广泛研究^[17]。

但是 Nogo-A 与炎症物质在 PD 中的关系如何, Nogo-A 与 TH 关系如何, 目前尚无研究报导。我们知道, PD 的发生发展与炎症物质的存在密切相关, 那么 Nogo-A 有无可能通过调控炎症因子的分泌和 TH 的表达参与 PD 过程呢? 本研究参考众多研究^[18-19], 我们使用 LPS 诱导 PC12 细胞建立 PD 模型, ELISA 结果显示炎症因子 TNF- α 和 IL-6 均分泌增多, Western blot 显示 TH 表达较正常细

胞降低, 模型建立符合典型 PD 的病理基础; 使用 shRNA 沉默 Nogo-A, 我们发现, LPS 作用 PC12 细胞后 TNF- α 和 IL-6 分泌量有所下降, TH 的表达基本接近正常 PC12 细胞。这提示我们, Nogo-A 在 PD 中起着促进作用, 可能通过某种途径增加炎症物质的分泌以及降低 TH 的表达从而加速 PD 的进程, 但是具体的机制我们仍不得而知, 需要进一步研究探讨。

参考文献

- [1] Mehta NR, Nguyen T, Bullen JW Jr, et al. Myelin-associated glycoprotein (MAG) protects neurons from acute toxicity using a ganglioside-dependent mechanism [J]. ACS Chem Neurosci, 2010, 1(3): 215-222.
- [2] Chao PK, Lu KT, Jhu JY, et al. Indomethacin protects rats from neuronal damage induced by traumatic brain injury and suppresses hippocampal IL-1 β release through the inhibition of Nogo-A expression [J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 121.
- [3] Lee JK1, Zheng B. Role of myelin-associated inhibitors in axonal repair after spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2012, 235(1): 33-42.
- [4] 闵嵘, 赵志伟, 姬志娟, 等. Nogo 与 Nogo 受体在正常小鼠大脑的分布 [J]. 神经解剖学杂志, 2005, 21(2): 195-198.
- Min R, Zhao ZW, Ji ZJ, et al. The distributions of Nogo and Nogo receptor in the brains of the mice [J]. Chinese J Neuroanat, 2005, 21(2): 195-198.
- [5] Cui Y, Masaki K, Yamasaki R, et al. Extensive dysregulations of oligodendrocytic and astrocytic connexins are associated with disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model [J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 42.
- [6] Schmandke A, Schmandke A, Schwab ME. Nogo-A: multiple roles in CNS development, maintenance, and disease [J]. Neuroscientist, 2014, 20(4): 372-386.
- [7] Wang T, Xiong JQ, Ren XB, et al. The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review [J]. Brain Res Bull, 2012, 87(6): 499-503.
- [8] Delay C, Tremblay C, Brochu E, et al. Increased LINGO1 in the cerebellum of essential tremor patients [J]. Mov Disord, 2014, 39(13): 1637-1647.
- [9] Inoue H, Lin L, Lee X, et al. Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in

(下转第 402 页 to page 402)

- (24):691-697.
- [17] Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C [J]. *Hepatology* 2003, 38(8):1449-1457.
- [18] Ratzliff V, Charlotte F, Heurtier A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(13):1898-1906.
- [19] Bydder M, Yokoo T, Hamilton G, et al. Relaxation effects in the quantification of fat using gradient echo imaging[J]. *Magn Reson Imaging*, 2008, 26(6):347-359.
- [20] Reeder SB, Robson PM, Yu H, et al. Quantification of hepatic steatosis with MRI: the effects of accurate fat spectral modeling[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2009, 29(8):1332-1339.
- [21] Dixon WT. Simple proton spectroscopic imaging [J]. *Radiology*, 1984, 153(12):189-194.
- [22] D'Assignies G, Martin R, Abdesslem K, et al. Noninvasive quantitation of human liver steatosis using magnetic resonance and bioassay methods [J]. *Eur. Radiol*, 2009, 19(6):2033-40.24.
- [23] Hu HH, Kim HW, Nayak KS, et al. Comparison of fat-water MRI and single-voxel MRS in the assessment of hepatic and pancreatic fat fractions in humans [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2011, 18(6):841-847.
- [24] Leporq B, Ratiney H, Pilleul F, et al. Liver fat volume fraction quantification with fat and water T1 and T2 * estimation and accounting for NMR multiple components in patients with chronic liver disease at 1.5 and 3.0 T [J]. *Eur Radiol*, 2013, 23(6):2175-2186.
- [25] Yokoo T, Shiehorteza M, Hamilton G, et al. Estimation of hepatic proton-density fat fraction by using MR imaging at 3.0 T [J]. *Radiology*, 2011, 258(8):749-759.
- [26] Kammen BF, Pacharn P, Thoeni RF, et al. Focal fatty infiltration of the liver: analysis of prevalence and CT findings in children and young adults [J]. *Am J Roentgenol*, 2001, 177(16):1035-1039.
- [27] Yokoo T, Bydder M, Hamilton G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and fat grading accuracy of low-flip-angle multiecho gradient-recalled-echo MR imaging at 1.5 T[J]. *Radiology*, 2009, 251(18):67-66.
- [28] Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009, 16(7):141-149.

(编辑 刘清海)

(上接第395页 from page 395)

- Parkinson's disease models[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(36): 14430-14435.
- [10] Seiler S, Pollini D, Di Santo S, et al. Antagonizing Nogo-receptor 1 promotes the number of cultured dopaminergic neurons and elongates their neuritis [J]. *Neuroreport*, 2013, 24(18): 1047-1052.
- [11] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 [J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 434-439.
- [12] GrandPré T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration [J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 547-551.
- [13] Yang Y, Liu Y, Wei P, et al. Silencing Nogo-A promotes functional recovery in demyelinating disease [J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(4): 498-507.
- [14] Wang Y, Gu J, Feng X, et al. Effects of Nogo-A receptor antagonist on the regulation of the Wnt signaling pathway and neural cell proliferation in newborn rats with hypoxic ischemic encephalopathy [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(3): 883-886.
- [15] Tong S, Xiong N, Shen J. RNA interference suppression of Nogo-66 receptor prevents Nogo-66-mediated inhibition of invasion and adhesion and simultaneously increases cell apoptosis in C6 cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(5): 2171-2178.
- [16] Mi YJ, Hou B, Liao QM, et al. Amino-Nogo-A antagonizes reactive oxygen species generation and protects immature primary cortical neurons from oxidative toxicity[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(7): 1175-1186.
- [17] Zhu Y, Zhang J, Zeng Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(4): 350-358.
- [18] Yagnik RM, Benzeroual KE. Tigecycline prevents LPS-induced release of pro-inflammatory and apoptotic mediators in neuronal cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(2): 686-693.
- [19] Zarrindast MR, Javadi-Paydar M, Delphi L, et al. Morphine-induced nitric oxide production in PC12 cells [J]. *Arch Iran Med*, 2012, 15(7): 404-408.

(编辑 孙慧兰)