

申克孢子丝菌翻译控制肿瘤蛋白的结构分析与功能预测

黄怀球^{1*}, 钟毅¹, 赵静¹, 张静², 孙九峰³, 张晓辉⁴, 袁立燕¹

(1.中山大学附属第三医院皮肤性病科, 广东 广州 510630; 2.中山大学附属孙逸仙纪念医院皮肤性病科, 广东 广州 510120;
3.中山大学中山医学院热带病防治研究教育部重点实验室, 广东 广州 510080; 4.广东省皮肤病防治研究所, 广东 广州 510045)

摘要:【目的】从 cDNA 文库中识别申克孢子丝菌翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)的基因并分析预测其结构功能和应用前景。【方法】利用 NCBI 和 ExPASy 网站中的各种基因和蛋白的序列结构信息分析工具,结合 DNASTar 和 VectorNTI suite 生物信息学分析软件包,从申克孢子丝菌全长 cDNA 质粒文库中识别 TCTP 的基因及其编码区,分析、预测该基因编码的蛋白结构特征和功能。【结果】TCTP 基因全长 621 bp, 编码区具有 207 个氨基酸。在 GenBank 同源序列中,其与蓝菌属真菌(*Grosmannia clavigera*) TCTP 氨基酸序列一致性达到 78%。理论预测分子质量为 64581.4 ku。无质体和线粒体定位序列。预测结果显示编码蛋白含有 1 个跨膜区、7 个亲水性部位和 5 个主要 B 细胞表位。与蓝菌属真菌及球毛壳霉(*C.glabosum*)的 TCTP 进化关系最近。【结论】应用生物信息方法筛选出申克孢子丝菌 TCTP 的 cDNA 全长序列并预测其结构与功能、潜在抗原表位,为进一步实验研究该蛋白生物学特性提供了依据。

关键词:申克孢子丝菌;翻译控制肿瘤蛋白(TCTP);生物信息学

中图分类号:R379.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2012)04-0454-06

Molecular Structure Analysis and Function Prediction on *Sporothrix schenckii* Translationally Controlled Tumor Protein

HUANG Huai-qiu^{1*}, ZHONG Yi¹, ZHAO Jing¹, ZHANG Jing², SUN Jiu-feng³, ZHANG Xiao-hui¹, YUAN Li-yan¹
(1.Department of Dermatology and Venereology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2.Department of Dermatology and Venereology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;
3.Department of Parasitology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 4.Guangdong Skin Disease and STD Prevention Institute, Guangzhou 510045, China)

Abstract:【Objective】The structure and properties about encoding protein of the translationally controlled tumor protein (TCTP) from *Sporothrix schenckii* were analyzed and predicted by bioinformatics. 【Methods】A full-length cDNA sequence encoding TCTP from cDNA plasmid library of *Sporothrix schenckii* was identified by using tools of bioinformatics at webs sites of NCBI, ExPASy and software DNASTar, VectorNTIsuite. The characteristics of the deduced protein were predicted by employing bioinformatics software package supplied by the website of ExPaSy. 【Results】A complete open reading frame of 621 bp was included in the full cDNA sequence encoding SS.TCTP. The sequence of TCTP analysis showed that it had high homology in the amino acids sequence from other species in GenBank. The molecular weight of SS.TCTP was predicated to be 64581.4 ku and the coding protein was demonstrated to contain one transmembrane region, three main hydrophilic regions and 5 main B cell epitopes. The relationship of phylogenesis between SS.TCTP and TCTP of other fungus is close. 【Conclusions】The full-length cDNA sequence encoding TCTP was screened from cDNA library of *Sporothrix schenckii* bioinformatics and the structure and characteristics of the gene and protein of SS.TCTP as well as the immunological properties were predicted.

Key words: *Sporothrix schenckii*; translationally controlled tumor protein; bioinformatics

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4):454-459]

收稿日期:2012-01-30

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800277)

作者简介:黄怀球,*通信作者,博士,副主任医师,硕士生导师,研究方向:真菌性皮肤病,E-mail:hhuaiqiu@medmail.com.cn

申克孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*, SS)为一种土壤、木材及植物的腐生菌,广泛分布于世界各地,尤其以热带和温带地区居多,其可通过破损的皮肤或黏膜进入人体引起皮肤、皮下组织及淋巴系统的亚急性和慢性感染,亦可在体内播散引起系统性损害。申克孢子丝菌在人体内和 37 °C 条件下呈酵母相,在 26 °C 时则呈菌丝相。对申克孢子丝菌的形态学、流行分布、基因分型及检测、诊断和治疗等研究,大部分都局限于细胞水平或小基因片段水平,其基因组序列至今未大量公布。我们从构建的申克孢子丝菌的 cDNA 文库,获得了其翻译控制肿瘤蛋白(translationally controlled tumor protein, TCTP)基因的全长序列。应用生物信息学方法,对 SS 的 TCTP(SS.TCTP)的结构特征和功能进行分析和预测。

1 材料与方法

1.1 材料

申克孢子丝菌菌株号 CBS359.36 由荷兰真菌生物多样性研究中心(Course Medical Mycology, CBS)馈赠。转录组文库 Locus_13912_Contig_1,由广州爱健生物技术有限公司完成构建。其他真菌及其他物种的 TCTP 氨基酸序列检索自 GenBank。大量表达序列标签(EST)通过大规模测序获得,筛选去除杂质数据,再应用 CleanReads 和 Oases+Velvet 拼接获得 Unigenes。运用美国国家生物技术信息中心(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站的基本局部比对搜索工具(BlastX, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、综合蛋白核酸分析工具包(vector NTI suite)AlignX、DNASTAR 软件、瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统(ExPASy, <http://ca.expasy.org/>)等软件进行生物信息学分析。

1.2 SS.TCTP 基因的识别

将文库编号为 Locus_13912_Contig_1 的序列与 GenBank 中的序列通过 NCBI 网站的基因比对搜索工具 BlastX 程序进行比对,分析判断该基因的翻译序列与其他蛋白质氨基酸序列的一致性,并确定是否为全长基因。保守功能域的预测采用 Blast conserved domains 软件。

1.3 SS.TCTP 核酸和氨基酸序列分析及进化树构建

利用 NCBI 中 ORF Finder 功能确定其完整的

编码序列(coding sequence),然后用 Translation 程序推导并输出氨基酸序列,对比 Blast conserved domains 结果是否一致。AlignX 比对分析 SS.TCTP 与 GenBank 中其他物种的同源蛋白氨基酸序列,综合性蛋白核酸分析工具包(vector NTI suite)构建分子进化树^[1]。

1.4 SS.TCTP 蛋白理化性质及结构评估

利用蛋白分析专家系统 ExPASy 预测 SS.TCTP 的理化性质、一级结构中的修饰位点、亚细胞定位、氨基酸的跨膜区拓扑结构,利用 PredictProtein 对二级结构、分子形态、亲水性等进行预测。通过二级结构比对进行 TCTP 的空间构象建模^[1]。

1.5 SS.TCTP 的亲水性分析及线性 B/T 细胞表位预测

标识氨基酸强亲水性线性表位,亲水性分布图使用 DNASTAR 软件分析绘制。利用 BepiPred1.0 服务器预测 B 细胞表位。运用表位预测服务器 SYFPEITHI、Pro-Pred2I 和 Net MHC3.0,分别对 TCTP 可能产生 9 个氨基酸残基的 H2-d (包括 H22Kd、H22Ld 和 H22Dd)限制性 CTL 表位进行预测。SYFPEITHI 预测分值大于 20 的 9 肽;同时保存 ProPred2 I 返回结果的前 15 位;寻找二者的重复序列。同时结合 Net MHC 3.0 预测结果,进行综合分析,选定阈值(0.75),对综合预测值 COMB>0.75 的九肽进行归纳^[1]。

2 结果

2.1 文库编号 Locus_13912_Contig_1 插入序列的 Blastx 分析

申克孢子丝菌文库编码 Locus_13912_Contig_1 基因在 Blastx 结果中与球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)的 TCTP 在覆盖范围内一致性达到 57%,与蓝菌属真菌(*Grosmannia clavigera*)TCTP 一致性达到 79%。该克隆基因的全长超过裂殖酵母 TCTP 的完整编码序列,所以该基因是孢子丝菌翻译控制肿瘤(TCTP)蛋白的全长基因序列,完整编码区是其最大的 ORF (图 1)。用 Blast conserved domains 软件功能分析发现该段序列完整的 TCTP 保守结构域(图 2)。

2.2 对 SS.TCTP 与其他物种 TCTP 进行同源性比较同时构建分子进化树

在 12 个物种中,应用 vectorNTIsuite 软件邻位

相连法(neighbour joining 法)对 TCTP 的氨基酸序列进行比较并构建分子进化树。结果表明 SS.TCTP 与 *Grosmannia clavigera* 及毛壳霉的 TCTP 进化关系最近(图 3),这与 BlastX 分析的结果是一致的。

2.3 SS.TCTP 蛋白质理化性质

预测 SS.TCTP 水溶液在分光光度计 280 nm 波长处的摩尔消光系数为 10625 mol·L⁻¹·cm⁻¹;其蛋白相对分子质量理论值为 64581.4, 等电点为 5.02。TCTP 氨基酸序列不含色氨酸, 半胱氨酸在蛋白 TCTP 水溶液浓度为 1 g/L 时形成二硫键的吸光系数为 0.165。值得注意的是 TCTP 上存在自身激活及相互作用的区域,可以由此形成二聚体,并发挥细胞因子作用。当苏氨酸为在成熟肽 N 端时,在酵母中表达 TCTP 蛋白的半衰期大于 20 h,在大肠埃希菌中表达则大于 10 h,而在哺乳类动

物网状红细胞体外表达的半衰期为 7.2 h。TCTP 在溶液中的不稳定指数为 39.21,判断其属于稳定蛋白。亲水性 0.714,含脂指数 25.23。

2.4 预测 SS.TCTP 亚细胞定位、翻译后修饰

Motif scanning (Motifscan) 分析显示 SS.TCTP 包含 2 个潜在酰胺化位点、2 个潜在天冬酰胺糖化位点、2 个潜在蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点、5 个潜在酪蛋白激酶 II (CK2) 磷酸化位点、2 个潜在 N-肉豆蔻酰位点、2 个潜在双组分核定位信号位点以及 2 个 TCTP 位点。预测该蛋白无线粒体定位序列以及分泌信号肽序列核质体。

2.5 预测 SS.TCTP 的亲水性特征、拓扑结构和二级结构

Hmmtop 预测 N 端位于膜内 (i),C 端位于膜外(O),TMpred 预测在 17 ~ 33 位氨基酸之间有 1

```

Query 211  MLIYSDILTGDEIISDSYDLKDVGGIVFEADCAMITEEAVSVDTGanasaeaaeeegvedt 390
M+IY DIL+ DEIISDS+DLK+V IVFEADCAMITE AV VD GANASAEAA+EG ED+
Sbjct 1     MIIYKDILSDDEIISDSFDLKEVDDIVFEADCAMITEGAVDVDIGANASAEAADEGTEDS 60

Query 391  aVRVNNIHSFRLQNTSFDKKGYLAYLKGYLKAVKAALQEAGKSEDEIKTFETGAQKFVK 570
AVRVNNI+HSFRLQ+TSFDKK YL+YLKGYLK+VK+ +QE GKSE+EIK FETGAQKFVK
Sbjct 61   AVRNNIWHFRLQSTSFDKKSYLSYLGKYLKSVKSKMQETGKSEEEIKAFETGAQKFVK 120

Query 571  ETLNPNFKDYEF 606
          TLLNPNFKD+EF
Sbjct 121  NTLNPNFKDFEF 132

```

图 1 SS.TCTP 全长 ORF 编码的氨基酸序列图

Fig.1 Full-length amino acid sequence encoded by ORF of SS.TCTP

The complete coding sequence(CDS)621 base pairs(bp) encodes a putative protein of 207 amino acids.



图 2 预测 SS.TCTP 的保守功能域图

Fig.2 Conserved domain of SS.TCTP was predicted by Blast conserved domain

The ordinal number of amino acid was marked by the number.

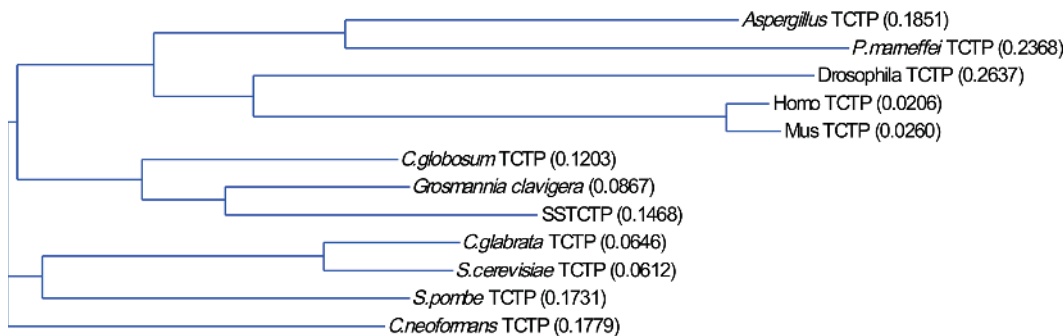


图 3 SS.TCTP 与其他物种 TCTP 的分子进化分析图

Fig.3 SS.TCTP with TCTP from other species in phylogenetic analysis

```

AA      FSLFFFLPLSFFEEGRRRGEKGRKNQYIRRRRLFSSPSSTPTRPHFASPISTTAPSTLPF
PROF_sec  EEEEE     EEEHHH             EEE     EEEEE

AA      HGSSSQTTVKMLIYSDILTGDEIISDSYDLKDVGGIVFEADCAMITEEAVSVDTGANASA
PROF_sec  E      EEEEEEEEE     EEEE  EEEEEEEEEEEEE

AA      EEAEEGVEDTAVRVNNIIHSFRLQNTSFDKKGYLAYLKGYLKAVKAALQEAGKSEDEIKT
PROF_sec             EEEEEEEEEEEEE     HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH     HHHHHH

AA      FETGAQKFVKETLLPNFKDYEFAPASR
PROF_sec  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
    
```

图 4 ExPASy, predictprotein 在线预测 SS.TCTP topology 结构、二级结构图

Fig.4 The topology, secondary structure of SS.TCTP by Predictprotein and ExPASy

AA: amino acid; PROF sec: secondary structure; H: α coiling; E: folding

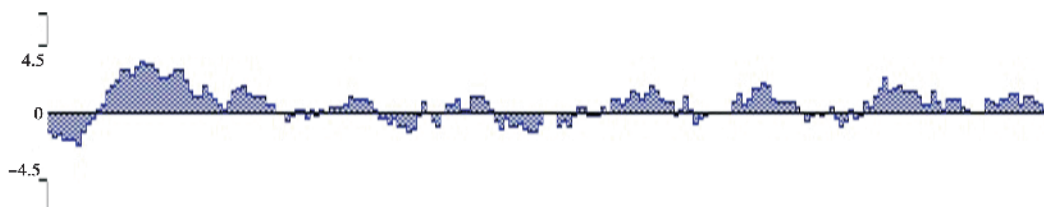


图 5 SS.TCTP 的亲水性分布图

Fig.5 Hydrophilicity profile of SS.TCTP

Longitudinal axis and abscissa axis represent hydrophilicity and amino acid sequence, respectively



图 6 SS.TCTP 的 3D 结构功能氨基酸的空间图

Fig.6 3D structure and special position of key amino acids of binding site in functional center

Between Arrow: α screwy structure

个从里到外的 α 螺旋(H)结构,蛋白大部分位于膜外(图 4)。Sec 预测 α 螺旋(H)、折叠(E)和无规则卷曲比例分别为 22.71:27.54:49.76。

2.6 SS.TCTP 的亲水性分析和 B/T 细胞表位预测

DNAstar 软件包推导亲水性分布(图 5)显示其线性抗原决定簇的位置分别是:①11 ~ 47aa;②59 ~ 68aa;③83 ~ 92aa;④115 ~ 129aa;⑤142 ~ 1556aa;⑥169 ~ 1907aa;⑦194 ~ 207aa。分析预测 B 细胞抗原表位结果显示,该氨基酸序列中有 5 个表位结构:13 ~ 5aa (EGRRRGEKGRKN),35 ~ 67aa (SSPSSTPTRPHFASPISTTAPSTLPF HGSSSQ),109 ~ 132aa (AVSVDTGANASAEAEEGVEDTA),169 ~ 184aa (QEAGKSEDEIKTFETG),200~ 207aa (DYE FAPASR),其中 2 个主要的表位 109 ~ 132aa、169 ~ 184aa 包括了 TCTP 的活性位点。T 细胞表位预测显示 3 个重复序列:HLA-A * 0201 153~ 168 (YLAYLKGYLKAVKAAL)、70 ~ 79 (KMLIY SDILT)、96~112(IVFEADCAMITEEAVSV)。

2.7 预测 SS.TCTP 的三维结构与酶关键氨基酸定位

SWISS-MODEL 模拟的 SS.TCTP 三维结构图(图 6),将结构酶活性中心的关键酶氨基酸表示在结构图上;TCTP 决定分子功能得区域在 α 螺旋

结构(图 6 箭头范围内),也是重要表位所在区域。

3 讨 论

TCTP 是一个高度保守、大量表达的真核蛋白家族,上世纪 80 年代首先从小鼠的肿瘤细胞中被发现。TCTP 基因转录后在细胞内没有立即翻译成蛋白,而是在细胞进入分裂周期的瞬间大量翻译,研究者认为 TCTP 的表达量主要是受翻译水平的调控,因此将其命名为“翻译控制肿瘤蛋白”^[2]。通过对其功能研究发现,TCTP 具有刺激嗜碱性粒细胞和肥大细胞释放组胺的作用,因此也称为“组胺释放因子”(HRF)^[3]。Rid 等^[4]发现稻类黑变病菌 *C.herbarum* TCTP 是一个 IgE 结合抗原,5/9 的荨麻疹病人的 IgE Ab 能够结合到人和真菌的 TCTP 上引起自身免疫性疾病。另外,TCTP 在细胞外发挥类似细胞因子的作用,调控炎症和免疫细胞增殖,对感染性疾病及免疫功能障碍疾病起到重要作用^[5-6]。研究发现,对 TCTP 反应的病人更易发生哮喘,质子泵抑制剂可通过减少 TCTP 的分泌起到抗过敏的作用^[7]。对申克氏孢子丝菌 TCTP 基因的理化性质、结构特征、进化亲缘性和功能预测的研究,为深入研究其致病性提供了重要信息。

本文从申克孢子丝菌 cDNA 文库中筛选出质粒,经 NCBI 网站 Blastx 在线分析,发现该基因编码序列与 GenBank 中其他物种的 TCTP 氨基酸序列同源性可达 57%左右,具有 TCTP 的保守功能域和特征氨基酸序列,因此推测该质粒中序列为申克孢子丝菌 TCTP 基因。TCTP 基因的编码区、限制性酶识别位点、蛋白质理化性质的分析,有助于我们选用适合的表达载体制定克隆表达策略,提高目的蛋白的表达效果,获得有活性的重组蛋白对进一步研究申克孢子丝菌 TCTP 对双链 RNA 激活的蛋白激酶 (PKR, double strand RNA activated protein kinase) 的激活、促进组胺分泌以及其他特征有指导意义。TCTP 拓扑结构预测显示它是一个跨膜蛋白,没有质体及线粒体的定位序列,有研究表明^[8],在氧化压力环境下,TCTP 谷胱甘肽化后从细胞质定位转运到线粒体,据此推测 SS.TCTP 存在于膜受体,结合其可连接到微管蛋白上与钙离子结合的特性,分布在表膜的蛋白可成为有潜力的药物的分子靶点,或是诊断抗原的候选分子。拓扑学分析 SS.TCTP 发现其潜在的 T 细胞表位序列 153~

168aa (YLAYLKGYLKAVKAAL) 与潜在的 B 细胞抗原表位序列 169~184aa (QEAGKSEDEIKTFETG) 位于 α 螺旋中,由于 α 螺旋是决定分子功能的区域,特异性抗体与之结合后,就不能正常行使调节功能,从而影响整个免疫反应过程。暴露在表膜上的 SS.TCTP 分子可能作为免疫攻击的靶点,介导补体的杀伤作用、抗体的 ADCC 作用和细胞免疫杀伤,因此 SS.TCTP 可能是一个疫苗候选分子。T 细胞表位预测显示其有 3 个重复序列,可设计合成 1 条多表位基因及其表达产物来研制和发展疫苗,同时携带多个目标抗原的相关表位,达到介导细胞免疫的协同作用,提高免疫保护效果。

真菌 TCTP 基因与人类同源基因序列一致性大部分超过 41%,预测三维结构相似,进化过程保留了三个主要结构域 α 螺旋、 β 折叠和自由环,因而保留了类似的 B 细胞表位。过去的研究发现^[9],大部分发生交叉反应的真菌存在共同反应的表位结构,且交叉抑制试验提示 IgE 识别人类、链格孢菌 (*A.alternata*) 和稻类黑变病菌 (*C.herbarum*) 的 TCTP 共同表位,*A.alternata* 明显存在更多的抗原簇,*C.herbarum* 又比人存在额外的抗原簇。生物信息学预测 *A.alternata* TCTP 定位了两个主要 B 细胞表位,此两表位处于蛋白质表面,从而可发生抗原抗体反应。本研究预测的 SS.TCTP 保留了 3 个主要结构,且两个主要 B 细胞表位 109aa~132aa (AVSVDTGANA SA EEAEEGVEDTA) 和 169aa~184aa (QEAGKSEDEIKTFETG) 在三维结构上定位在自由环和 α 螺旋处,与前其他物种同源序列预测的定位一致。通过与其他物种比对及构建进化树,可了解进化过程中选择表达的情况,考虑选取 TCTP 或其优势表位作为药物靶点研制疫苗,则必须考虑它与人 TCTP 的同源性,及结合 TCTP 在其他物种的特性,选取 TCTP 与人有差别、但又比较关键的序列来进行实验研究。

综上所述,本研究应用生物信息方法筛选出申克氏孢子丝菌 TCTPcDNA 全长序列,并预测到其结构与功能、潜在抗原表位等与其他物种同源序列相似性较大,为进一步研究该蛋白生物特性,综合考虑候选疫苗抗原种类,表位组合,候选药物靶点提供了依据。

致谢:感谢荷兰真菌多样性研究中心 (CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre) Sybren de Hoog 教授馈赠申克孢子丝菌株 (CBS359.36)。

参考文献:

- [1] 黄艳, 黄江, 胡旭初, 等. 亚洲带绦虫烯醇酶基因及其蛋白质的结构与功能[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2008, 29(5): 6-12.
- [2] Gross B, Gaestel M, Bohm H, et al. cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(20): 8367-8371.
- [3] MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, et al. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor[J]. Science, 1995, 269(5224): 688-690.
- [4] Rid R, Simon-Nobbe B, Langdon J, et al. Cladosporium herbarum translationally controlled tumor protein (TCTP) is an IgE-binding antigen and is associated with disease severity [J]. Mol Immunol, 2008, 45(2): 406-418.
- [5] Bheekha-Escura R, MacGlashan DW, Langdon JM, et al. Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10[J]. Blood, 2000, 96(6): 2191-2198.
- [6] MacDonald SM, Bhisutthibhan J, Shapiro TA, et al. Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(19): 10829-10832.
- [7] Choi S, Min HJ, Kim M, et al. Proton pump inhibitors exert anti-allergic effects by reducing TCTP secretion [J]. PLoS One, 2009, 4(6): e5732.
- [8] Arcuri F, Papa S, Carducci A, et al. Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity [J]. Prostate, 2004, 60(2): 130-140.
- [9] Rid R, Onder K, MacDonald S, et al. Alternaria alternata TCTP, a novel cross-reactive ascomycete allergen[J]. Mol Immunol, 2009, 46(16): 3476-3487.

(编辑 刘清海)

(上接第 453 页 from page 453)

- Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved[J]. Hippocampus, 2010, 20(8): 949-961.
- [3] Chien CT, Shyue SK, Lai MK. Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy[J]. Transplantation, 2007, 84(9): 1183-1190.
- [4] Espana L, Fernandez Y, Rubio N, et al. Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 87(1): 33-44.
- [5] Matsuoka N, Yukawa H, Ishii K, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-xL prevents cell death in primary neuronal culture of the rat [J]. Neurosci Lett, 1999, 270(3): 177-180.
- [6] Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, et al. Bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death.[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(10): 4304-4308.
- [7] Huang J, Nakamura K, Ito Y, et al. Bcl-xl gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats [J]. Circulation, 2005, 112(1): 76-83.
- [8] Bolanos J P, Almeida A, Stewart V, et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases[J]. J Neurochem, 1997, 68(6): 2227-2240.
- [9] Lao F, Li W, Han D, et al. Fullerene derivatives protect endothelial cells against NO-induced damage [J]. Nanotechnology, 2009, 20(22): 225103.
- [10] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death[J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 3-15.
- [11] Edsjö A, Holmquist L, Pålman S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation[J]. Semin Cancer Biol, 2007, 17(3): 248-256.

(编辑 刘清海)