

EGb761 促进臂丛根性撕脱伤运动神经元功能修复的多靶点机制

刘佛林¹, 汪丽清¹, 周丽华¹, 袁群芳¹, 吴国珍², 吴武田³

(中山大学 1. 基础医学院人体解剖教研室, 2. 附属第一医院中医科, 广东 广州 510080;
3. 香港大学医学院解剖系, 香港)

摘要: 【目的】研究银杏叶标准提取物(EGb761)保护创伤脊髓运动神经元的细胞机制。【方法】成年 Sprague-Dawley 雄性大鼠行臂丛神经根撕脱术后, 随机分为: 撕脱组(生理盐水治疗)和 EGb761 组[EGb761 100 mg/(kg·d) 治疗]。各组动物分别存活 5 d、2、4、6 周后处死。硝酸还原酶法检测大鼠脊髓组织 NO 含量和 cNOS 酶活力, 取 C7 节段切片行胆碱乙酰转化酶(ChAT)、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)免疫组化、NADPH-d 酶组化和中性红活细胞染色。【结果】EGb761 组与撕脱组相比: 不仅降低脊髓组织 NO 含量($\mu\text{mol/g}$) (2 周组 0.24 vs 0.36, 4 周组 0.22 vs 0.30, 6 周组 0.19 vs 0.23; P 均 < 0.05), 也降低脊髓组织 cNOS 酶活力(U/mg) (5 d 组 0.047 vs 0.057, 2 周组 0.13 vs 0.20, 4 周组 0.065 vs 0.14, 6 周组 0.061 vs 0.083; P 均 < 0.05)。EGb761 恢复部分损伤运动神经元的 ChAT 活性、EGb761 降低 nNOS 蛋白的异位表达, NADPH 表达率(%) (2 周组 26.0 vs 40.7, 4 周组 21.7 vs 36.9, 6 周组 18.2 vs 26.7, 8 周组 12.6 vs 20.9; P 均 < 0.05); EGb761 提高损伤运动神经元的生存率(%) (5 d 组 92.2 vs 87.1, 2 周组 77.1 vs 71.3, 4 周组 56.8 vs 49.8, 6 周组 48.0 vs 43.4, 8 周组 31.3 vs 22.0; P 均 < 0.05)。【结论】EGb761 可能通过多靶点干扰损伤运动神经元的基因表达、蛋白酶活性以及代谢进程, 减少臂丛撕脱伤诱导的运动神经元死亡。

关键词: 银杏叶标准化提取物(EGb761); 神经损伤和修复; 运动神经元; 脊髓

中图分类号: R361+.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0634-06

Multiple Targets Effects of EGb761 on Functional Repairing of Injured Spinal Motor Neurons Following Brachial Roots Avulsion

LIU Fo-lin¹, WANG Li-qing¹, ZHOU Li-hua¹, YUAN Qun-fang¹, WU Guo-zhen², WU Wu-tian³

(Department of Anatomy, 2. The First Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;
3. Department of Anatomy, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: 【Objective】 To study the cellular mechanism of EGb761 effect on injured spinal motor neurons. 【Methods】 Male adult Sprague-Dawley rats were performed with roots avulsion of right brachial plexus under the microscope. Then the injured rats were randomly divided into avulsion groups (with normal saline treatment) and EGb761 groups [with EGb761 100 mg/(kg·d) treatment]. After survival for 5 days, 2, 4, 6, or 8 weeks, the rats were killed, respectively. The NO and cNOS levels were detected by nitrate reductase method. The frozen sections of injured C7 spinal segments were prepared for ChAT, nNOS immunohistochemistry, NADPH-d enzyme stain and neutral red survival cell stain. 【Results】 Compared to avulsion groups, EGb761 not only decreased NO levels ($\mu\text{mol/g}$) (0.24 vs 0.36 at 2 week, 0.22 vs 0.30 at 4 week, 0.19 vs 0.23 at 6 week, with $P < 0.05$, respectively), but also decreased the activities of cNOS enzyme (U/mg) (0.047 vs 0.057 at 5 d, 0.13 vs 0.20 at 2 week, 0.065 vs 0.14 at 4 week, 0.06 vs 0.083 at 6 week, with $P < 0.05$ respectively). In EGb761 treated rats, expression of ChAT were up-regulated and de novo nNOS expression were down-regulated with decreased amount of NADPH-positive motor neurons (%) (26.0 vs 40.9 at 2 week, 21.7 vs 36.9 at 4 week, 18.2 vs 26.7 at 6 week, 12.6 vs 20.9 at 8

收稿日期: 2005-09-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(5001760); 国家科技部 '973' 分课题(2003CB5-15303)

作者简介: 刘佛林(1976-), 男, 江西高安人, 硕士生; 通讯作者: 周丽华, 教授, 博士生导师. E-mail: zhoulh@mail.sysu.edu.cn

week, with $P < 0.05$ respectively); EGb761 enhanced the survival rate of injured motor neurons (%) (92.2 vs 87.1 at 5 d, 77.1 vs 71.3 at 2 week, 56.8 vs 49.8 at 4 week, 48.0 vs 43.4 at 6 week, 31.3 vs 22.0 at 8 week, with $P < 0.05$ respectively). 【Conclusion】 It is suggested that EGb761 may interfere with genomics, proteomics, and metabolic mechanism in root avulsion-induced spinal motor neuron neuropathy.

Key words: extracts of Ginkgo biloba (EGb761); nerve injury and repair; motor neuron; spinal cord

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):634-639]

标准的银杏叶提取物 (Ginkgo biloba extracts, EGb761), 商品名金纳多 (GINATON)、达那康 (TANAKAN) 在中枢神经系统的作用非常广泛, 主要包括清除自由基抗氧化、促进局部血液循环, 因而大多应用在心脑血管疾病的药物治疗^[1]。EGb761 对损伤外周神经的作用的研究较少^[2,3]。我们前期研究发现 EGb761 可以增加臂丛撕脱伤运动神经元的存活率^[4,5], 但作用机制不明确, 本实验力图通过体内研究, 从组织细胞水平探讨 EGb761 修复损伤的脊髓运动神经元功能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料来源

雄性 SD 大鼠 144 只, 体质量 200 ~ 300 g, 由中山大学实验动物中心提供。银杏叶标准化提取物 EGb761 干粉由中国药品生物制品检验所提供, 生产批号 0866-9701, 水溶液当天按每只大鼠 100 mg/kg 加双蒸水配成 1 mL 溶液; 一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)分型试剂盒, 蛋白定量试剂盒均购自南京建成生物工程公司; 一抗: 鼠抗大鼠胆碱乙酰转化酶(choline acetyltransferase, ChAT)单克隆抗体, 工作浓度 1 800 (Chemicon, CA); 兔抗大鼠神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)抗体, 工作浓度 1 3000 (Santa Cruz, Inc); 二抗: 马抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG (工作浓度均为 1 400) 以及 ABC 试剂盒均购自 Vector Laboratories, Burlingame, CA; -尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸黄递酶(-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase, -NADPH-d)、氯化硝基四氮唑蓝(nitro-blue tetrazolium, NBT)以及 3,3'-四盐酸二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)均购自 Sigma 公司。

1.2 臂丛根性撕脱手术和 EGb761 治疗

臂丛根性撕脱手术及 EGb761 用药方案详见参考文献[4, 5]。动物经 ketamine (80 mg/kg) 和

xylazine (8 mg/kg) 肌肉麻醉后, 在 Olympus 手术显微镜下暴露右侧臂丛(brachial plexus)的 C₅~T₁ 神经根, 以显微止血钳钳夹牢神经根, 向外侧逐一撕脱 5 个神经根, 手术显微镜下可辨认撕下的脊神经前根和背根神经节为撕脱手术成功标志。手术后损伤大鼠随机分为 EGb761 组和撕脱组。大鼠随机分组每组动物 8 例, 每天上午 10 点腹腔注射 1 mL EGb761 (100 mg/kg) 或 1 mL 生理盐水。

1.3 酶化学反应检测脊髓组织 NO 含量和 NOS 酶活力

手术后大鼠分别存活 5 d、2 周、4 周和 6 周。截取损伤脊髓节段新鲜组织, 按南京建成工程公司提供试剂盒中的说明书, 提取脊髓组织蛋白质, 双缩脲法测定脊髓组织蛋白含量; 硝酸还原酶反应, 722 分光光度计化学比色法检测脊髓组织 NO 含量和结构型 NOS(constitutive NOS, cNOS) 酶活力。

1.4 免疫组织化学染色

实验动物以 10 g/L 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 经左心室向升主动脉内插管灌注生理盐水及 40 g/L 冷多聚甲醛 PBS 固定液。以 C7 上下神经根之中点为标志, 取 C7 节段脊髓, 置相同固定液内后固定 4 h 后, 转入 300 g/L 蔗糖置 4 冰箱过夜, 组织沉底后以半导体恒冷滑动切片机做冠状切片, 片厚 40 μm, 隔 3 取 1, 收集于 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 中。漂浮法以 PBS 代替一抗作空白对照, 参照 ABC 试剂盒中的说明书, 分别行 ChAT 和 nNOS 免疫组化染色, 以细胞浆染成棕黄色, 同时空白对照胞浆无染成棕黄色为标准。

1.5 NADPH-d 酶组化和中性红染色与运动神经元计数

以漂浮法进行 -NADPH-d 染色显示 NOS 阳性神经元^[6]。NADPH-d 染液含 NADPH-d 10 mg; NBT 2.5 mg。将冰冻切片置染液 37 °C 孵育 1~2 h 后, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次, 裱片干燥后, 用中性红复染 3~5 min, 乙醇常规脱水透明, 中性树脂封片。在 20 倍显微镜下计数每例动物 C7

节段双侧脊髓前角运动神经元, 选 10 张切片, 以胞体清晰, 可见胞核为计数标准, 以正常侧存活运动神经元数目为 100%, 计算损伤侧 NADPH-d 阳性或存活运动神经元占正常侧存活运动神经元数目的百分比, 分别代表损伤侧 NADPH-d 阳性率和存活率。

1.6 统计学分析

用 SPSS 11.0 软件包进行统计分析, 计量指标用以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析 (ANOVA), 各时间点内撕脱组与 EGb761 组的比较使用 Student-Newmann-Keuls 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 EGb761 对受损脊髓组织 NO 含量的影响

两组各时间点脊髓组织 NO 含量见表 1, 多因素方差分析组间差异有显著意义, $F=103.78$, $P < 0.01$, 其中 5 d 时间点两组间无显著差异, $q = 1.26$, $P = 0.23$; 2、4 和 6 周时间点 EGb761 组均低于撕脱组, q 值分别为 8.16, 7.08, 2.95; P 值均 < 0.05 。

2.2 EGb761 对受损脊髓组织 cNOS 活力的影响

脊髓组织 cNOS 活力见附表, ANOVA 检验 3

组间差异有显著意义, 其中 5 d 时间点两组间差异无显著意义, $q = 0.77$, $P = 0.45$; 2、4 和 6 周时间点 EGb761 组均低于撕脱组, 差异均有显著意义。 q 值分别为 4.23, 7.80, 4.21; P 均 < 0.05 。

2.3 EGb761 对受损运动神经元 NOS 表达的影响

NADPH-d 酶组化(图 1)和 nNOS 免疫组化(图 2)染色显现的损伤前角运动神经元 nNOS 时空表达的变化规律基本一致: 各时间点正常侧运动神经元均不表达(图 1A, 2A); 损伤侧的表达从 5 d 开始, 2 ~ 4 周达高峰, 6 周以后逐渐下降, 直至 8 周。阳性反应颗粒最早出现在胞体、继而是神经突起; 最早反应出现在前角的中央核群、前核群和前外侧核群, 继而蔓延到后外侧和后内侧核群, 最后是前内侧核群; 前角灰白之内的血管壁都呈 NADPH-d 阳性反应(图 1B, 2B)。EGb761 治疗组损伤前角运动神经元 nNOS 时空表达的变化规律与损伤组一致, 但是反应强度和阳性神经元的数目均有明显的减低, 且血管壁 nNOS 反应阴性(图 1C, 2C)。ANOVA 分析 3 组间 NADPH-d 阳性神经元数目差异有显著意义, 其中 5 d 时间点两组间无显著差异, $q = 0.65$, $P = 0.53$; 2、4、6 和 8 周时间点 EGb761 组均低于撕脱组, q 值分别为 5.99, 8.58, 4.37 和 6.45; P 值均 < 0.05 (表 1)。

表 1 撕脱对照组与 EGb761 治疗组间受损脊髓组织各指标的比较

Table 1 Comparison of data of injured spinal cords between the avulsion control and the EGb761 treated groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	NO level($\mu\text{mol/g}$)	cNOS activity(U/mg)	NOS positive motor neurons(%)	Survival motor neurons(%)
5 d Avulsion	8	0.10 \pm 0.03	0.057 \pm 0.003	5.4 \pm 1.8	87.1 \pm 3.4
EGb761	8	0.08 \pm 0.03	0.047 \pm 0.022	4.9 \pm 1.8	92.2 \pm 3.5 ¹⁾
2 week Avulsion	8	0.36 \pm 0.03	0.204 \pm 0.045	40.6 \pm 4.7	71.3 \pm 3.0
EGb761	8	0.24 \pm 0.03 ¹⁾	0.13 \pm 0.025 ¹⁾	26.0 \pm 5.6 ¹⁾	77.1 \pm 1.8 ¹⁾
4 week Avulsion	8	0.30 \pm 0.03	0.14 \pm 0.024	36.9 \pm 4.5	49.8 \pm 4.0
EGb761	8	0.22 \pm 0.01 ¹⁾	0.065 \pm 0.013 ¹⁾	21.7 \pm 2.2 ¹⁾	56.8 \pm 4.1 ¹⁾
6 week Avulsion	8	0.23 \pm 0.03	0.083 \pm 0.009	26.7 \pm 4.2	43.4 \pm 2.2
EGb761	8	0.19 \pm 0.02 ¹⁾	0.061 \pm 0.016 ¹⁾	18.2 \pm 3.5 ¹⁾	48.0 \pm 2.1 ¹⁾
8 week Avulsion	8			20.9 \pm 2.7	22.0 \pm 3.2
EGb761	8			12.6 \pm 2.5 ¹⁾	31.3 \pm 5.0 ¹⁾

Compared with avulsion group: 1) $P < 0.05$

2.4 EGb761 对受损运动神经元存活率和 ChAT 表达水平的影响

存活神经元在中性红染色条件下均呈红色, 可见清晰的尼氏体(图 3A); 损伤侧运动神经元明显丢失开始于撕脱后 6~8 周, 前角明显萎缩, 尚

存运动神经元胞体皱缩, 胞浆含量明显减少, 尼氏体模糊不清, 神经元从多角形变为圆形; 周围胶质细胞数量增多(图 3B); 神经元丢失的次序与 NADPH-d 阳性反应出现的次序一致。EGb761 组损伤侧前角运动神经元丢失的规律同撕脱组; 但

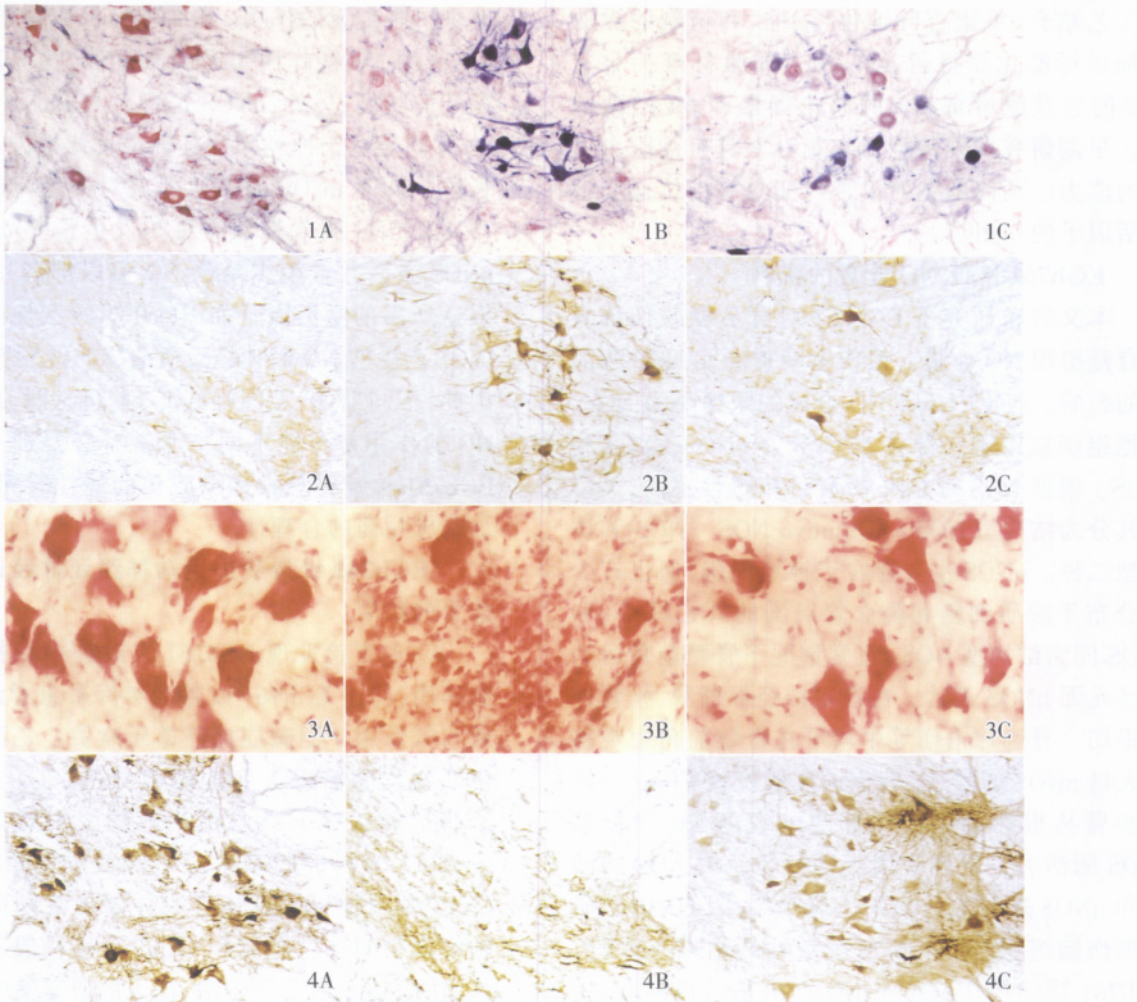


图 1 损伤脊髓 C7 节段运动神经元 NADPH-d 染色

图 2 损伤脊髓 C7 节段运动神经元 nNOS 表达

图 3 损伤脊髓 C7 节段运动神经元中性红染色

图 4 损伤脊髓 C7 节段运动神经元 ChAT 表达

Fig. 1 NADPH-d reactions in motor neurons in injured spinal C7 segments ($\times 10$)

Fig. 2 The expression of nNOS in motor neurons in injured spinal C7 segments ($\times 10$)

Fig. 3 Neutral red stain in transverse sections of injured spinal C7 segments ($\times 40$)

Fig. 4 The expression of ChAT in motor neurons in injured spinal C7 segments ($\times 10$)

A: the intact side of C7 segment; B: the injured side of C7 segment treated with normal saline; C: the injured side of C7 segments treated with EGb761

是死亡程度明显降低, 存活运动神经元的形态与正常侧运动神经元形态一致, 周围胶质细胞反应明显减少(图 3C)。定量分析各时间点受损脊髓 C7 节段前角运动神经元存活率的结果显示: 5 d、2、4、6 和 8 周时间点 EGb761 组均高于撕脱组, q 值分别为 2.94, 4.37, 3.42, 4.26 和 4.44; P 值均 < 0.05 (表 1)。正常情况下脊髓前角运动神经元均能合成 ChAT, ChAT 免疫组化反应均为阳性(图 4A); 臂丛根性撕脱侧脊髓前角, 随着损伤时间的延长, ChAT 阳性反应逐步减弱, 2 周以后损伤侧 C7 节

段已经极少见到 ChAT 阳性反应的运动神经元(图 4B); EGb761 治疗组运动神经元 ChAT 阳性神经元的数目与阳性神经元的反应强度均高于撕脱对照组, 阳性神经元的形态和分布与正常侧相似, 但是阳性神经元的数目少于正常侧(图 4C)。

3 讨 论

银杏树 (*Ginkgo biloba*) 是中国特有的古老植物, 按德国施瓦伯公司专利和法国博福-益普生提

取工艺结合,将银杏叶纯化、浓缩、和精制的提取物加以标准化而得名 EGb761, 质量标准含有 24% 的总黄酮醇甙, 7% 的原花青素和 6% 的萜内脂。早期研究发现黄酮苷和花青素具有清除自由基的能力, 萜内酯中的银杏内酯具有拮抗血小板激活因子的作用^[1,7]。

3.1 EGb761 降低 NO 含量的机制

本文着重研究了 EGb761 对臂丛撕脱伤诱导的脊髓组织 NO 含量、损伤运动神经元 NOS 酶活性的影响。催化内源性 NO 合成的限速酶为 NOS, 根据组织或细胞来源将 NOS 分为 nNOS, eNOS 和 iNOS。根据 NOS 对 Ca^{2+} /CaM 的依赖性不同, 又将其分为结构型 NOS(constitutive NOS cNOS)和诱导型二种。nNOS 主要存在于神经细胞, 但也有少量分布于胶质细胞和脑血管周围的其它纤维, 和 eNOS 同为结构型 NOS。正常情况下脊髓前角运动神经元无 nNOS 表达。在脊髓神经根撕脱、坐骨神经根切、脊髓冲击伤等中均可在脊髓前角中观察到大量 nNOS 的表达。我们的实验发现 EGb761 能减少臂丛根性撕脱损伤脊髓组织内 NO 含量和 cNOS 酶活力, 下调受损运动神经元内 NOS 酶活性和 nNOS 蛋白表达水平。这个结果与国内外研究损伤脑组织 NO 和 NOS 酶活性的结果一致^[8,9]。EGb761 清除损伤脑组织 NO 自由基的机制有: 直接结合 NO; 阻止 NO 和超氧阴离子自由基反应生成过氧亚硝基, 从而减轻损伤组织的过氧化损害; 降低 NO 合成限速酶 NOS 活力; 下调损伤诱导的 nNOS 免疫反应强度; 降低巨噬细胞 iNOS mRNA 表达水平。我们的结果支持以上理论, 并进一步表明在周围神经系统 EGb761 也是通过上述机制影响创伤运动神经元的修复进程。

3.2 EGb761 保护受损运动神经元的 NOS 酶机制

本研究发现: EGb761 提高损伤运动神经元存活率的幅度低于其下调 NOS 的幅度。我们分析其中原因可能有: 损伤后期神经营养因子缺失诱导的凋亡机制是运动神经元丢失的主要原因, 而急性创伤诱发的过氧化损害, 可能只在早期发挥加速神经元死亡速度的作用; 本实验检测到 EGb761 降低了脊髓组织 cNOS 和 nNOS 的活性, 但是没有检测 eNOS 的含量, 因而不排除 EGb761 使 eNOS 水平下降, 从而影响微循环不利于损伤运动神经元存活的可能; 损伤早期局部聚集的 NO

有保护神经元的作用。在脊神经损伤的早期, 表达 nNOS 的 NO 能作用于周围微血管, 发挥其调节微循环的功能; 另外, nNOS 也可以和 Bcl-2 及 GAP-43 共同表达于神经元及其轴突、背根神经节及生长锥, 此时 nNOS 的表达上调对神经元起保护和再生作用并调节其轴突可塑性生长^[10]; 还有早期 nNOS 激活并产生少量的 NO 可以抑制一些 iNOS 表达所需的激活因子如 NF B 等的活性而减少由 iNOS 产生的 NO 对神经元所造成的继发性损害^[11]。因此, 不同损伤、不同神经元、不同时期, 损伤组织 NO 的作用都可能不同; 非常有必要进一步研究 EGb761 治疗臂丛根性撕脱伤的最佳时间窗, 以增加临床用药的合理性。

3.3 EGb761 维持受损运动神经元神经递质合成能力的机制

许多实验发现 EGb761 有改善中枢神经递质的作用, 前述 EGb761 改善老年痴呆患者认知水平就与其作用于胆碱能神经递质有关; 乙酰胆碱是由底物乙酰辅酶 A 和胆碱在 ChAT 催化下生成, 乙酰辅酶 A 来自线粒体内丙酮酸的氧化脱羧反应, 50% -80% 的胆碱来自突触前膜的重摄取, 而 ChAT 则由神经元胞体合成并随轴浆顺向运输到轴突末梢储存。胆碱和 ChAT 分别构成乙酰胆碱代谢的限速底物和限速酶。前人的研究发现 EGb761 可以增加大鼠海马胆碱能纤维突触前膜 Na^+ - K^+ ATP 酶的活性, 从而增加胆碱的重摄取量^[12], 本实验发现 EGb761 还能上调损伤神经元内 ChAT 的活性; 进一步证实了 EGb761 保护损伤神经元的胆碱能机制。

以上研究表明, 臂丛根性撕脱伤后立即并持续给与 EGb761 治疗, 至少可以延缓运动神经元的死亡时间, 减轻死亡程度。其作用机制与 EGb761 减少损伤局部 NO 含量和 cNOS 活性, 下调 nNOS 蛋白表达, 维持乙酰胆碱递质的功能有关; EGb761 还有上调 c-jun^[9]、保护损伤运动神经元细胞核和线粒体形态及维持神经元代谢水平的作用 (另文发表)。因此我们认为 EGb761 作用于损伤脊髓组织的多个分子靶点, 通过多种机制的综合保护臂丛根性撕脱伤的运动神经元。

参考文献:

- [1] MACLENNAN K, DARLINGTON C L, SMITH P F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and

- ginkgolide B[J]. *Prog Neurol*, 2002, 67(3):235-257.
- [2] HSU S H, CHANG C J, TANG C M, et al. In vitro and in vivo effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 on seeded Schwann cells within poly (DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration [J]. *J Biomater Appl*, 2004, 19(1):163-182.
- [3] OZTURK G, ANLAR O, ERDOGAN E, et al. The effect of Ginkgo extract EGb761 in cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 196(1):169-175.
- [4] 周丽华, 李芳澜, 袁群芳, 等. 两种天然抗氧化剂对臂丛根性撕脱后脊髓运动神经元保护作用的比较 [J]. *中华显微外科杂志*, 2003, 26(3):204-206.
- [5] 李芳澜, 周丽华, 袁群芳, 等. EGb761增强c-jun表达减少轴突撕脱后运动神经元的死亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(10):1783-1785.
- [6] 林浩添, 吴荣耀, 谢瑶, 等. 神经损伤诱导脊髓运动神经元nNOS表达的中枢差异[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(4):385-387.
- [7] 谢培山. 银杏叶标准提取物EGb761及银杏叶制剂的质量评价[J]. *中国中药杂志*, 1999, 24(1):3-5.
- [8] MAK Y T, CHAN W Y, LAM W P, et al. Immunohistological evidences of Ginkgo biloba extract altering Bax to Bcl-2 expression ratio in the hippocampus and motor cortex of senescence accelerated mice[J]. *Microsc Res Tech*, 2006, 69(8):601-605.
- [9] MONCADA S, BOLANOS J P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration[J]. *J Neurochem*, 2006, 97(6):1676-1689.
- [10] COLASANTI M, SUZUKI H. The dual personality of NO[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21(7):249-252.
- [11] BREDET D S, PAUL M H, SOLOMON H S. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide[J]. *Nature*, 1990, 247(25):768-770.
- [12] KRISTOFIKOVA Z, KLASCHKA J. In vitro effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on the activity of presynaptic cholinergic nerve terminals in rat hippocampus[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 1997, 8(1):43-48.

(编辑 张恩健)

(上接第618页 from page 618)

- al. The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(42):39401-39408.
- [9] KALDERON D, ROBERTS B L, RICHARDSON W D, et al. A short amino acid sequence able to specify nuclear location[J]. *Cell*, 1984, 39(3 pt 2):499-509.
- [10] RAICHAUDHURI A, BHATTACHARYYA R, CHAUDHURI S, et al. Domain analysis of a groundnut calcium-dependent protein kinase: nuclear localization sequence in the junction domain is coupled with nonconsensus calcium binding domains[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(15):10399-409.
- [11] KODAMA R, KONDO T, YOKOTE H, et al. Nuclear localization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is not involved in the initiation of apoptosis induced by 1-Methyl-4-phenyl-pyridium iodide (MPP+)[J]. *Genes Cells*, 2005, 10(12):1211-9.
- [12] LIANG S H, CLARKE M F. A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(46):32699-703.

(编辑 张敏瑞)