

应用 GFP 质粒构建及转染技术探讨 Syk(L)核移位机制

王 磊, 胡 英, 宋新明, 汪建平

(中山大学附属第一医院结直肠肛门外科, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】通过研究 Syk(L)在乳腺癌细胞亚细胞器中的分布和移位机制,探讨 Syk(L)抑制乳腺癌的可能性机制。【方法】采用细胞核、胞浆分离技术和 Western blot 的方法,检测乳腺癌细胞系 BT474 中两种 Syk 蛋白异构体在细胞内的分布。构建绿色荧光蛋白(GFP)和 Syk(L)核移位相关功能域融合蛋白质质粒,转染入 Cos 7 细胞内,荧光显微镜下观察融合蛋白在细胞内的分布。【结果】BT474 细胞的细胞浆中可检测到 Syk(S)和 Syk(L)的表达,细胞核中只检测到 Syk(L)的表达。在 Cos 7 细胞中,GFP 与 Syk(L)的缺失域(deletion domain, DEL 域)融合蛋白均匀分布于细胞内,GFP 与 Syk(L)的 IDB 域融合蛋白聚集于细胞核中;将 DEL 域上的 294K、300K、及 305K 突变域非碱性氨基酸后构建成 GFP-IDB(L)-M,突变的融合蛋白则失去核聚集现象。【结论】在乳腺癌细胞中,Syk(L)可从细胞胞浆移位到细胞核内。Syk(L)的 IDB 域具有完整的核移位功能,能将融合的胞浆蛋白 GFP 转移到细胞核内;DEL 域的碱性氨基酸具有核定位信号功能。Syk(L)在乳腺癌细胞中的抑癌功能与其核移位有关。

关键词:长脾脏酪氨酸激酶;绿色荧光蛋白;核移位;乳腺癌

中图分类号:R730.2

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)06-0614-05

Using GFP Constructs Making and Transfection Technology to Explore Mechanism of Syk(L) Nuclear Translocation

WANG Lei, HU Ying, SONG Xin-ming, WANG Jian-ping

(Department of Colorectal Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】By studying the subcellular localization of Syk(L) in breast cancer cells and the mechanism of its nuclear translocation, explore the possible mechanism of Syk(L) tumor suppression function.

【Methods】Cytosolic and nuclear fractionation experiments were used to separate the cytosolic and nuclear cell lysate of breast cancer cell lines BT474. Western blot was used to analyze the subcellular localization of Syk. Green fluorescent protein(GFP) and Syk(L) nuclear translocation domain fusion proteins were constructed and transfected into Cos 7 cells. The subcellular localization of fusion proteins were observed under fluorescence microscope. 【Results】Both Syk(S) and Syk(L) was found in the cytosolic extracts of breast cancer cell BT474, while only Syk(L) was found in the nuclear extracts. GFP and Syk(L)'s deletion(DEL) domain fusion protein was observed expressing in the cells evenly. Fused IDB domain of Syk(L) was able to transport GFP into nucleus and congregated in the nucleus. When the basic amino acids 294K, 300K and 305K in the DEL domain were mutated to non-basic amino acids asparagine, the mutated GFP-IDB(L) fusion protein lost the ability of nuclear congregation. 【Conclusions】Syk(L) is able to translocate to nucleus from cytoplasm in breast cancer cell. The IDB domain of Syk(L) has complete nuclear translocation function, which is able to transport cytoplasm protein GFP into nucleus. The basic amino acids in DEL domain of Syk(L) contains nuclear localization signal. Syk(L) tumor suppression function is possibly associated with its nuclear translocation.

Key words: Syk(L); GFP; nuclear translocation; breast cancer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6):614-618, 639]

脾脏酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)

是一种非受体型酪氨酸激酶,被认为是一种细胞

收稿日期:2006-05-05

基金项目:教育部博士点基金资助项目(No.20020558050)

作者简介:王 磊(1969-),男,河南信阳人,博士,主治医师;汪建平,教授,博士生导师,通讯作者.E-mail:wangj pgz@yahoo.com.cn

浆蛋白,在血液细胞信号传导中起着重要的作用。Syk由NH₂端的2个SH2功能域(SH2 domain)和COOH端的激酶功能域(kinase domain,KD)构成,两个SH2功能域之间的区域称为功能域间域A(interdomain A,IDA),第2个SH2功能域和激酶功能域之间的部分称为功能域间域B(interdomain B,IDB)。由于SYK基因在转录时外显子之间选择性拼接,翻译成两种蛋白异构体^[1],即全长的Syk(L)和在IDB上缺失23个氨基酸的Syk(S),缺失的部分称为缺失域(deletion domain,DEL域)。近年来Syk在乳腺癌中具有潜在的抑癌功能的报道引起人们的关注^[2],我们在前期研究中发现在两种Syk蛋白异构体中,只有Syk(L)具有抑制乳腺癌细胞侵袭力功能,而Syk(S)对乳腺癌细胞侵袭力功能没有影响^[3]。本文拟通过对Syk(L)在乳腺癌细胞亚细胞器分布和移位机制进行研究,以探讨导致Syk(L)抑癌功能的可能性机制。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

pEGFP质粒购自美国Clontech Laboratories公司,EcoR、BamH和T4连接酶购自公司,脂质体FuGENE6和蛋白酶抑制剂复合物购自Roche公司,G418、RPMI 1640和DMEM细胞培养液购于美国Gibco公司,胎牛血清购于美国Hyclone公司,Syk(N-19)、Ki-67、Oct-1(C-21)、Actin(I-19)及GFP(FL)抗体均购自Santa Cruz生物技术公司,检测蛋白质浓度的BCA试剂、抗羊二抗、抗兔二抗及超强信号显影剂均购自Pierce公司,3,3'-diaminobenzidine、Spermidine和Spermine购自Sigma公司,核染色剂DAPI购自Sigma公司。

1.2 质粒构建

质粒pEGFP-DEL的构建是为了表达Syk(L)的DEL域与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的融合蛋白。插入片段采用PCR的方法合成:以pCDNA3.1-Syk(L)为模板^[3],上游引物为5'-TAGAATTCGACTTGGTCAGCGG GTG-3',下游引物为5'-ATGGATCCCTTTCTGT GGCCAGGCTTTG-3'。采用EcoR和BamH酶切PCR产物及载体质粒pEGFP-C3后用T4 DNA连接酶连接而成。

质粒pEGFP-IDB(L)的蛋白表达产物是绿色荧光蛋白与Syk(L)的IDB域融合蛋白。插入片段

采用PCR的方法合成:以pCDNA3.1-Syk(L)为模板,上游引物为5'-TAGAATTCCTCAAAA AATCGGCACACAGG-3',下游引物为5'-ATG GATCCCAGCAGCTTTTCGGTCCAG-3'。EcoR和BamH酶切PCR产物及载体pEGFP-C3后用T4 DNA连接酶连接。

pEGFP-IDB(L)-M构建方法与pEGFP-IDB(L)相同,唯一区别是采用pCDNA3.1-Syk(L)-M^[3]为PCR模板。pCDNA3.1-Syk(L)-M亦是采用两步PCR为基础的突变技术将Syk(L)的DEL域上的3个赖氨酸(294K、300K、305K)突变为天冬酰胺。

构建的所有质粒均通过DNA测序分析加以证实。

1.3 细胞培养

乳腺癌细胞系BT474和MB435、白血病细胞系K562、淋巴瘤细胞系Raji及猴肾成纤维细胞系COS7均购自American Type Culture Collection。所有细胞系均培养在公司推荐的培养液内,培养液中加入体积分数10%的胎牛血清、10 g/L谷氨酰胺、青霉素及链霉素的终浓度均为100 U/mL,于37℃下、体积分数5%饱和湿度的培养箱内培养。用2.5 g/L胰酶和质量分数0.02%EDTA消化传代,每3~4 d传代1次。取对数生长期的细胞进行实验。

1.4 细胞的胞浆、胞核蛋白分离试验

大约 1×10^7 细胞经过胰酶消化后,200 μ g离心沉淀5 min除去上清液,加入800 μ L缓冲液A [10 mmol/L HEPES (pH 7.4), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT和1 \times 蛋白酶抑制剂复合物],在冰上孵育10 min,将细胞转移到杜氏均质器(Dounce homogenizer)中。细胞经过12~18次的均质(pestle B)后,采用台盼蓝染色的方法检测细胞膜破损百分率,当破损百分率达到95%时,离心3 000 \times g, 4、10 min,收集上清液留作胞浆蛋白。采用400 μ L缓冲液B [50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES(pH 8.0), 体积分数25%丙三醇, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L spermidine, 及0.15 mmol/L spermine]洗涤管底的细胞核两次,离心3 000 \times g, 4、5 min,在洗涤后的细胞核内加入150 μ L缓冲液C [350 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES(pH 8.0), 体积分数25%丙三醇, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L spermidine, 及0.15 mmol/L spermine],在4℃条件下震荡30 min,离心20 000 \times g, 4、30 min,

上清液留作为细胞核提取物。所有的缓冲液中加入 1 倍的蛋白酶抑制剂。

1.5 Western blot

采用 BCA 试剂检测蛋白含量, 取 50 μg 的全细胞裂解液、细胞浆提取物、细胞核提取物进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。在胞核、胞浆分离试验中, 在转膜并用封闭液封闭硝酸纤维素膜后, 根据 Ki-67(345 ku) 或者 Oct-1(110 ku)(细胞核蛋白标记物)、Syk(L)(72 ku)、及 Actin(42 ku)(细胞浆蛋白标记物)分子质量的不同, 将纤维素膜剪成 3 个部分, 分别用抗体 Ki-67(抗体稀释浓度为 1:100)、Oct-1(C-21)(抗体稀释浓度为 1:200)、Syk(N-19)(抗体稀释浓度为 1:1000)、及 Actin(I-19)(抗体稀释浓度为 1:200)与靶蛋白进行结合, 时间均为室温下 1 h。TTBS 液洗涤 3 次, 每次 10 min, 然后将膜转移到加入二抗的 TTBS 液中结合 1 h。抗 Ki-67 抗体所用二抗为 1:6000 稀释的抗鼠抗体, 抗 Syk 抗体和抗 Oct-1 抗体所用的二抗是 1:10000 稀释的抗兔抗体, 抗 Actin 抗体所用二抗为 1:4000 稀释的抗羊抗体。然后将膜转移到 TTBS 液中洗涤 3 次, 每次 20 min。辣根过氧化物酶聚集的第二抗体与一抗结合后, 采用超强信号显影剂检测、拍照。

所有全细胞裂解液采用 1 倍的 SDS 细胞裂解液(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20 g/L SDS, 体积分数 5%丙三醇)裂解, 用细胞刮刀将细胞收集到 1.5 mL 的离心管中, 超声破碎细胞, 使蛋白释放。100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使蛋白变性。鉴定 GFP 及 GFP 融合蛋白所用一抗为 1:400 稀释的抗 GFP 抗体, 二抗为 1:10000 稀释的抗兔抗体。

1.6 荧光显微镜分析

为了研究 Syk(L)的核移位机制, 将 Syk 功能域(DEL、IDB 及突变的 IDB)连接在绿色荧光蛋白上, 荧光显微镜下观察融合蛋白在细胞内亚细胞器中的分布。将 Cos 7 细胞培养在置入到 6 孔细胞培养板的载玻片上 1 d 后, 采用 Fugene 6 试剂将质粒 pEGFP、pEGFP-DEL、pEGFP-IDB(L)和 pEGFP-IDB(L)-M 转染到不同的孔内, 培养 24~48 h。DPBS 清洗细胞后, 常温下加入新鲜配置的 DPBS/40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 30 min; DPBS 洗涤两次, 每次 10 min。采用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dapi/DPBS 进行细胞核染色, 常温下 10 min; 然后用 DPBS 洗涤两次, 每次 20 min。最后将培养在载玻片上的细胞放在荧光显微

镜下观察计数不同融合蛋白在细胞胞浆和胞核中的分布。

将绿色荧光物质在细胞内均匀分布的细胞定义为非核聚集细胞, 细胞核内荧光物质明显增强的细胞定义为核聚集细胞。据此定义对各组转染细胞观察记数 100 个细胞, 表 1 中数值为 3 次独立实验的平均结果, 所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结 果

2.1 Syk(L)蛋白可移位到细胞核内

为了探讨抑癌基因 Syk 在细胞内的分布, 选用同时表达 Syk(L)和 Syk(S)蛋白的乳腺癌细胞系 BT474, 首先分离出细胞浆蛋白和细胞核蛋白部分, 采用 Western blot 的方法, 观察两种 Syk 蛋白异构体在分离的亚细胞成分中的分布。如图 1A 所示, T 表示全细胞裂解液; C 表示细胞浆提取液, 抗 Ki-67 抗体(细胞核蛋白标志物)的 Western blot 结果中未显示任何条带证明分离的细胞浆提取液未被细胞核蛋白交叉污染; N 表示细胞核提取液, 抗 Actin 抗体(细胞浆蛋白标志物)的 Western blot 结果中未显示任何条带证明分离的细胞核提取液未被细胞浆蛋白交叉污染。

在 BT474 分离的胞浆蛋白中, Syk(L)及 Syk(S)均有表达, 说明 Syk(L)及 Syk(S)均存在于细胞浆中; 而在细胞核蛋白提取液中, 只发现分子量较大的 Syk(L)蛋白的表达, 而未发现 Syk(S)。结果提示 Syk(L)蛋白在乳腺癌细胞中可移位到细胞核内, Syk(S)则只分布在细胞浆中。

Syk(L)在血液细胞中广泛表达。采用上述相同的胞核、胞浆分离技术和 Western blot 的方法, 检测白血病细胞 K562 和淋巴瘤细胞 Raji 的细胞浆中 Syk(L)的亚细胞器分布, 如图 1-B 所示, 显示 Syk(L)在细胞胞核和胞浆中均有表达, 说明在血液肿瘤细胞中 Syk(L)亦可以从细胞胞浆移位到细胞核内。

2.2 GFP 及构建的 GFP 与 Syk(L)功能域融合蛋白的检测

采用不表达 Syk 基因的乳腺癌细胞系 MB435, 分别转染质粒 pEGFP-C3、pEGFP-DEL、pEGFP-IDB(L)和 pEGFP-IDB(L)-M, 2 d 后裂解细胞, 采用 Western blot 的方法, 用 GFP 抗体检测 GFP 及构建的 GFP-Syk(L)功能域融合蛋白的表达, 如图 2 所

示, 转染的 GFP 质粒及融合蛋白质 GFP- DEL、GFP- IDB(L)和 GFP- IDB(L)- M 在 MB435 细胞中均有表达。

2.3 Syk(L)的 IDB 功能域具有核移位完整序列

Syk(S)只存在于细胞浆中, 而比 Syk(S)多出 23 个氨基酸的 DEL 域的 Syk(L)则可移位到细胞核内 (图 1A, B)。为了探讨 Syk(L)的核移位机制, 我们将 Syk(L)的 DEL 功能域连接到 GFP 上构建融合蛋白, 转染入 Cos 7 细胞中, 2 d 后在荧光显微镜下观察 GFP 及 Syk (L)- DEL 融合蛋白在细胞内的分布, 每项检查测重复 3 次(表 1)。GFP- DEL 在细胞内的分布与 GFP 相似, 91%的记数细胞均匀地分布于细胞内。若将 Syk(L)的 IDB 连接到 GFP 上后, 融合蛋白则移位到细胞核内, 核内聚集的 GFP- IDB 细胞比例高达 86.3%, 说明 Syk(L)的 IDB 内包含有向细胞核移位的完整序列, 可将胞浆蛋白 GFP 带入到细胞核内。

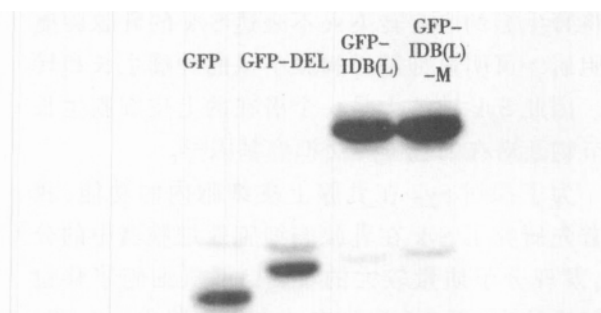


图 2 Western blot 检测 GFP 及 GFP- Syk(L)功能域融合蛋白的表达

Fig.2 GFP and GFP- Syk(L) domain fusion proteins' expression were examined by Western blot

GFP: green fluorescence protein; GFP- DEL:GFP fused to DEL domain of Syk(L) protein; GFP- IDB(L): GFP fused to IDB domain of Syk(L) protein; GFP- IDB(L)- M: GFP fused to mutated IDB domain of Syk(L) protein

移位所必需的。

表 1 GFP 和 GFP- Syk(L)功能域融合蛋白在 Cos 7 细胞内的分布

Table 1 GFP and GFP- Syk(L) domain fusion proteins' localization in the Cos 7 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Cytoplasm	Nucleus
GFP	89.3 \pm 2.5	10.7 \pm 2.5
GFP- DEL	91.0 \pm 2.5	9.0 \pm 2.5
GFP- IDB(L)	13.7 \pm 3.4	86.3 \pm 3.4
GFP- IDB(L)- M	94.7 \pm 1.7	5.3 \pm 1.7

The experiments repeated 3 times

3 讨 论

SYK 及它的同族体 Zap70 共同构成非受体型酪氨酸蛋白激酶中的 SYK 亚族^[4,5]。Syk 广泛表达于血液细胞中, 与被激活的细胞膜免疫受体结合后, 激活下游的多个细胞信号传导通路, 调节细胞的增生、分化及吞噬细胞的溶解^[6-8], 该途径被认为是血液细胞的主要激活方式。

上皮细胞内亦有 Syk 表达的报道, 首先报道 SYK 在乳腺病理生理中起作用的是 Coopman 等^[2], 他们的研究发现 Syk 在高度浸润性乳腺癌细胞系中的表达丢失, 并用原位杂交实验证明 SYK 的 mRNA 在正常乳腺上皮中高度表达、在原位导管癌中的表达降低、在浸润性导管癌中的表达丢失。

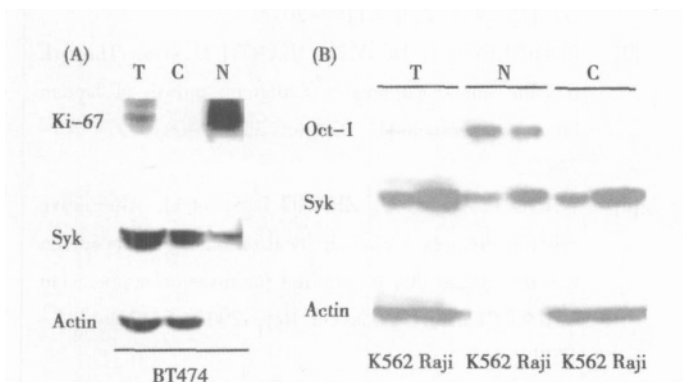


图 1 Syk(L)可移位到细胞核内

Fig.1 Syk(L) translocating to nucleus

Subcellular fractionation and Western blot were carried out to determine Syk (L) translocated to nucleus from cytoplasm in breast cancer cell line BT474 (A), and hematopoietic cell lines K562 and Raji.T:total cell lysates;C:cytosolic cell lysates;N:nuclear cell lysates

2.4 DEL 功能域内的碱性氨基酸是 Syk(L)核移位不可缺少的

核定位信号通常是由碱性氨基酸构成的, Syk(L)的DEL 域上共有 5 个碱性氨基酸, 若突变 294 K, 300K, 及 305K 成天冬酰胺构建 GFP- IDB(L)- M 后, GFP 与 IDB (L)- M 融合蛋白则失去在细胞核内聚集的功能, 如表 1 所示, 聚集到细胞核内的细胞比例与 GFP 或者 GFP- DEL 转染细胞相似, 只有 5.3%, 说明 DEL 域内碱性氨基酸在核定位中的关键作用, DEL 域内的碱性氨基酸是 Syk(L)细胞核

而将野生型的 Syk 转染入不表达 Syk 的乳腺肿瘤细胞后, 可明显抑制无胸腺小鼠的肿瘤生长和转移。因此 Syk 被认为是一个潜在的上皮细胞生长调节物及潜在的乳腺肿瘤抑癌基因^[2,3]。

为了探讨 Syk 在乳腺上皮细胞内的功能, 我们首先研究了 Syk 在乳腺癌细胞亚细胞器中的分布, 发现分子量较大的 Syk(L)可从细胞浆移位到细胞核内, 而 Syk(S)只表达于细胞浆中。Syk(L)的核移位现象不单纯存在于乳腺癌细胞中, 采用白血病细胞系 K562 和淋巴瘤细胞系 Raji 亦得出 Syk(L)具有细胞核内移位功能的结论。我们在前期研究中已经发现 Syk(L)在乳腺癌中的表达可以抑制肿瘤细胞的侵袭力, 而 Syk(S)对细胞的侵袭力没有影响^[3]。因此, 对 Syk(L)核移位现象的发现及其核移位机制的探讨非常重要, 将为 Syk 基因抑癌机制及其功能研究打开新的领域。

Syk 基因 NH₂ 端的 2 个 SH2 功能域和 COOH 端的激酶功能域的生物学功能被广泛研究, IDA 和 IDB 被认为是这些功能域之间连接部分, 长期被人们所忽视。本研究中发现 IDB 上较 Syk(S)多出 23 个氨基酸(即 DEL 域)的 Syk(L)可移位到细胞核内, 提示 IDB 上的 DEL 域对 Syk(L)的核移位起着不可缺少的作用。为了验证 DEL 域是否具备有核移位功能, 我们构建了 GFP-DEL 融合蛋白, 在荧光显微镜下观察到 DEL 并不能将细胞浆蛋白 GFP 转移到细胞核内, 而融合蛋白 GFP-IDB 则主要聚集在细胞核中, 说明只有 23 个氨基酸的 DEL 功能域并不是一个完整的核移位序列, 需要与周边的其他氨基酸序列一起、即 IDB 来完成蛋白的细胞核内转运。

核定位信号(nuclear localization signal, NLS)是存在于亲核蛋白内的一些短的氨基酸序列片段, 富含碱性氨基酸残基, 如赖氨酸(Lys, K)、精氨酸(Arg, R)^[9-11]。NLS 的氨基酸片段可以是一段连续的序列, 如 SV40 的大 T 抗原核定位信号 PKKKRKV, 称为单族 NLS^[9]; 碱性氨基酸也可以分成两段, 两段之间间隔约 10 个左右的非碱性氨基酸, 称为双族 NLS^[10,11], 如 p53 的核定位信号 KRALPNNTSSSPQPKKKP^[12]。Syk(L)的 DEL 域的氨基酸序列为 TWSAGGIISRIKSYSFPKPGHRK, 内有 5 个碱性氨基酸, 分别为 292R, 294K, 300K, 304R, 及 305K, 它们以两簇的方式存在, 即 RIK 及 KPGHRK, 中间被 5 个非碱性氨基酸分开。我们将

3 个赖氨酸(294K、300K、305K)突变为天冬酰胺后构建成突变的 GFP-IDB-M 融合蛋白质粒, 转染入 Cos 7 细胞后则失去核聚集的功能, 证实 DEL 域中碱性氨基酸具有核定位信号功能。

本文采用绿色荧光蛋白质粒构建及转染技术, 证明 Syk(L)蛋白核移位需要 IDB 完整序列, 发现 DEL 中的碱性氨基酸具有核定位信号功能, 阐明了 Syk(L)核移位的具体机制, 为 Syk(L)在乳腺癌中的抑癌功能研究开辟了新的方向: Syk(L)在乳腺癌中的抑癌功能可能于它移位到细胞核内所行使的功能有关。

参考文献:

- [1] YAMASHITA T, KAIRIYAMA L, ARAKI M, et al. Evidence for involvement of two isoforms of Syk protein-tyrosine kinase in signal transduction through the high affinity IgE receptor on rat basophilic leukemia cells[J]. *1998*, 123(6):1199-207.
- [2] COOPMAN P J, DO MTH, BARTH M, et al. The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells[J]. *Nature*, 2000, 406(6797):742-747.
- [3] WANG L, DUKE L, ZHANG P S, et al. Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22):4724-4730.
- [4] TURNER M, SCHWEIGHOFFER E, COLUCCI F, et al. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signaling[J]. *Immunity Today*, 2000, 21(3):148-54.
- [5] ABTAHIAN F, GUERRIERO A, SEBZDA E, et al. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk [J]. *Science*, 2003, 299(5604):247-51.
- [6] SIEGEL R, KIM U, PATKE A, et al. Nontranscriptional regulation of SYK by the coactivator OCA-B is required at multiple stages of B cell development[J]. *Cell*, 2006, 125(4):761-774.
- [7] LAW C L, CHANDRAN K A, SIDORENKO S, et al. Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(4):1305-1315.
- [8] WOODSIDE D G, OBERGFELL A, TALAPATRA A, et

(下转第 639 页 to page 639)

- 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)